

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

**Función de las proteínas  
Polycomb/Trithorax y Dp53 en  
la regulación de la expresión  
génica de *Drosophila***

ROCÍO SIMÓN SACRISTÁN

TESIS DOCTORAL

Madrid, 2013





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR



# Función de las proteínas Polycomb/Trithorax y Dp53 en la regulación de la expresión génica de *Drosophila*

Directora de Tesis: **Ana de Busturia Jimeno**  
Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (UAM-CSIC)

Memoria presentada por **Rocío Simón Sacristán** para optar al grado de Doctor  
en Biología Molecular por la Universidad Autónoma de Madrid



El presente trabajo ha sido realizado en el laboratorio de la **Dra. Ana María de Busturia Jimeno**, en el **Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”** de la Universidad Autónoma de Madrid, con la ayuda de una beca para estudios de posgrado concedida por la Universidad Autónoma de Madrid durante los años 2008/09 y de un contrato a cargo del Proyecto de investigación “From Genes to Shape: analysis of morphogenesis in *Drosophila* and Vertebrates” durante los años 2010/11 y 2013, concedido por el Ministerio de Educación y Ciencia (Consolider Programm\_CSD2007-0008) y del Proyecto “Función de los genes de los grupos Polycomb y trithorax en la morfogénesis, la respuesta inmune innata y la apoptosis de *Drosophila*” durante el año 2012 (BFU-2008-01154).





## ÍNDICE

---



# ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| SUMMARY  | 1  |
| 1.- INTRODUCCIÓN   | 3  |
| <hr/>  |    |
| 1.1.- <i>Drosophila melanogaster</i> COMO SISTEMA MODELO PARA EL ESTUDIO DE LA BIOLOGÍA DEL DESARROLLO.....          | 3  |
| 1.2.- MORFOLOGÍA DEL CUERPO DE <i>Drosophila</i> .....   | 4  |
| 1.3.- CONTROL DEL TAMAÑO DE LOS ÓRGANOS.....   | 7  |
| 1.3.1.- La vía de señalización de Notch.....   | 10 |
| 1.3.2.- La vía de señalización de JAK/STAT.....  | 12 |
| 1.3.3.- Mecanismos de regulación de la apoptosis.....  | 13 |
| 1.3.3.1.- Mecanismos de inducción de apoptosis mediados por la proteína Dp53.....                                    | 15 |
| 1.4.- REGULACIÓN EPIGENÉTICA DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIADA POR LAS PROTEÍNAS POLYCOMB (PcG) y TRITHORAX (trxG)..... | 16 |
| 1.4.1.- Complejos PcG y sus actividades bioquímicas.....   | 19 |
| 1.4.2.- Complejos trxG y sus actividades bioquímicas.....  | 20 |
| 1.4.3.- Grupos de proteínas ETP ( <u>E</u> nhancer of <u>T</u> rithorax and <u>P</u> olycomb).....                   | 21 |
| 2.- OBJETIVOS  | 23 |
| <hr/>  |    |
| 3.- MATERIALES Y MÉTODOS   | 25 |
| <hr/>  |    |
| 3.1.- ESTIRPES DE <i>Drosophila</i> UTILIZADAS Y OBTENCIÓN DE MOSCAS TRANSGÉNICAS.....                               | 25 |

|   |        |
|---|--------|
| 3.2.- SISTEMA GAL4/UAS.....   | 26     |
| 3.3.- INTERACCIONES GENÉTICAS.....  | 27     |
| 3.4.- MEDIOS DE CULTIVO.....  | 27     |
| 3.5.- TINCIONES HISTOQUÍMICAS CON X-GAL.....  | 27     |
| 3.6.- TINCIONES INMUNO-HISTOQUÍMICAS.....   | 28     |
| 3.6.1.- Tinción de discos imaginales con anticuerpos.....   | 28     |
| 3.6.2.- Tinciones con Faloidina y To-Pro3.....  | 29     |
| 3.7.- HIBRIDACIONES “IN SITU” DE DISCOS IMAGINALES.....   | 30     |
| 3.8.- RT-PCR CUANTITATIVA.....  | 30     |
| 3.9.- PURIFICACIÓN DEL ANTICUERPO ANTI-dRYBP A PARTIR DE LA PROTEÍNA HIS-dRYBP.....   | 31     |
| 3.10.- OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS NUCLEARES A PARTIR DE EMBRIONES DE <i>Drosophila</i> .....  | 32     |
| 3.11.- ENSAYOS DE INMUNOPRECIPITACIÓN.....  | 32     |
| 3.12.- ANÁLISIS POR ESPECTROMETRIA DE MASAS.....  | 33     |
| 3.13.- “WESTERN-BLOTTING”.....  | 34     |
| 3.14.- PREPARACIÓN DE CUTÍCULAS ADULTAS Y LARVIARIAS.....   | 35     |
| 3.15.- TÉCNICAS DE MICROSCOPIA.....   | 35     |
| 3.16.- ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO.....   | 36     |
| <br>4.- RESULTADOS  | <br>38 |
| <hr/>   |        |
| 4.1.- FUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE LOS GRUPOS POLYCOMB (PcG) Y TRITHORAX (trxG) EN EL CONTROL DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR Y APOPTOSIS..... | 38     |
| 4.1.1.- Estudio de los fenotipos asociados a la sobre-expresión e inactivación de las proteínas PcG y trxG.....                           | 38     |
| 4.1.2.- Estudio de la función de dRYBP en los mecanismos de apoptosis.....  | 44     |



|   |    |
|---|----|
| 4.1.2.1.- La sobre-expresión de dRYBP produce apoptosis dependiente de Dp53 y de JNK.....   | 44 |
| 4.1.2.1.1.- La apoptosis producida por la sobre-expresión de dRYBP es dependiente de la proteína Dp53.....  | 46 |
| 4.1.2.1.2.- La apoptosis producida por la sobre-expresión de dRYBP está asociada a la activación de la vía JNK.....   | 46 |
| 4.1.2.2.- La inactivación de <i>dRYBP</i> induce apoptosis....  | 47 |
| 4.1.3.- Estudio de la función de la proteína Polyhomeotic (PH) en los mecanismos de proliferación y apoptosis.....  | 49 |
| 4.1.3.1.- Efectos de la sobre-expresión de la proteína PH en la proliferación celular.....  | 49 |
| 4.1.3.1.1.- La sobre-expresión de PH produce proliferación hiperplásica en los discos imaginales de ala.....  | 50 |
| 4.1.3.1.2.- La sobre-expresión de PH produce apoptosis en los discos imaginales de ala.....   | 51 |
| 4.1.3.2.- Altos niveles de PH inducen transformaciones homeóticas.....  | 52 |
| 4.1.3.3.- Los sobrecrecimientos de los discos imaginales producidos por la ganancia de PH están mediados por la hiperactivación de la vía JAK/STAT..                                      | 55 |
| 4.1.3.4.- Efecto de la sobre-expresión de PH en la regulación de la ruta de señalización de DPP y del factor dMyc.....  | 58 |
| 4.1.3.5.- Efecto de la inactivación del gen <i>ph</i> en el crecimiento de los discos imaginales.....   | 59 |
| 4.1.3.5.1.- La inactivación de <i>ph</i> produce proliferación neoplásica en los discos imaginales de ala.....  | 59 |
| 4.1.3.5.2.- La inactivación de <i>ph</i> produce una débil inducción de apoptosis y una fuerte des-represión de las proteínas homeóticas UBX y ABD-B en los discos imaginales de ala..... | 61 |
| 4.1.3.6.- La inactivación del gen <i>ph</i> produce la  |    |

|   |    |
|---|----|
| activación de la vía JAK/STAT y de los mitógenos<br>DPP y WG.....   | 61 |
| 4.2.- ESTUDIO DEL PAPEL DE LA PROTEÍNA Dp53 EN EL CONTROL<br>DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR EN EL ALA DE <i>Drosophila</i> .....   | 63 |
| 4.2.1.- <i>Dp53</i> interacciona genéticamente con <i>Notch</i> y<br><i>wingless</i> .....  | 63 |
| 4.2.2.- <i>Dp53</i> regula transcripcionalmente la expresión de<br><i>Notch</i> .....   | 66 |
| 4.2.3.- Altos niveles de <i>Dp53</i> inducen la expresión de <i>Notch</i><br>y de <i>Wingless</i> .....   | 68 |
| 4.2.4.- Los efectos de la sobre-expresión de <i>Dp53</i> son<br>modulados en la falta y en la ganancia de función de<br><i>Notch</i> .....  | 71 |
| 4.2.5.- La proliferación generada por los altos niveles de<br><i>Dp53</i> no se rescata mediante la inhibición de la<br>apoptosis.....  | 74 |
| 4.3.- FUNCIÓN DEL GEN <i>dRYBP</i> EN LOS MECANISMOS<br>EPIGENÉTICOS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.....  | 77 |
| 4.3.1.- Búsqueda de proteínas que interaccionan con la<br>proteína <i>dRYBP</i> mediante análisis por espectrometría de<br>masas.....   | 78 |
| 4.3.2.- Análisis de las interacciones moleculares de la<br>proteína <i>dRYBP</i> con las proteínas <i>SCE/dRING</i> , <i>dKDM2</i> y<br><i>dBre1</i> .....  | 80 |
| 4.3.3.- Análisis de las interacciones genéticas entre <i>dRYBP</i> ,<br><i>Sce/dRING</i> , <i>dkdm2</i> y <i>dBre1</i> .....  | 82 |
| 4.3.3.1.- <i>dRYBP</i> interacciona genéticamente con<br><i>Sce/dRing</i> y con <i>dkdm2</i> .....  | 83 |
| 4.3.3.2.- <i>dRYBP</i> interacciona genéticamente con <i>dBre1</i>  | 87 |
| 4.3.4.- <i>dRYBP</i> participa junto con <i>Sce/dRing</i> y <i>dkdm2</i> en el<br>mantenimiento de la expresión mediada por el elemento<br>MCP, un elemento de respuesta a Polycomb del gen<br><i>Abdominal-B</i> ..... | 88 |

|   |                |
|---|----------------|
| <b>5.- DISCUSIÓN</b>  | <b>90</b>      |
| <hr/>   |                |
| <b>5.1.- FUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS PcG/trxG EN LA REGULACIÓN DE LOS MECANISMOS DE PROLIFERACIÓN Y APOPTOSIS.....</b>   | <b>90</b>      |
| 5.1.1.- Efecto de la modulación de los niveles de expresión de las proteínas PcG/trxG en la proliferación y apoptosis de los discos imaginales.....                   | 90             |
| 5.1.2.- Efecto de la modulación de los niveles de expresión de la proteína dRYBP en la apoptosis.....   | 92             |
| 5.1.3.- Efecto de la modulación de los niveles de expresión de la proteína PH en la inducción de la proliferación y la apoptosis de los discos imaginales de ala..... | 94             |
| <b>5.2.- <i>Drosophila</i> Dp53 REGULA LA EXPRESIÓN DE NOTCH PARA ASEGURAR UN BALANCE HOMEOSTÁTICO ENTRE PROLIFERACIÓN Y APOPTOSIS.....</b>                           | <b>96</b>      |
| <b>5.3.- dRYBP CONTROLA LOS ESTADOS TRANSCRIPCIONALES REPRIMIDOS Y ACTIVADOS A TRAVÉS DE SU INTERACCIÓN CON PROTEÍNAS DE LOS GRUPOS PcG Y trxG.....</b>               | <b>102</b>     |
| <br><b>6.- CONCLUSIONES</b>   | <br><b>107</b> |
| <hr/>   |                |
| <b>7.- BIBLIOGRAFÍA</b>   | <b>109</b>     |
| <hr/>   |                |
| <b>8.- ANEXOS</b>   | <b>134</b>     |
| <hr/>   |                |

|   |     |
|---|-----|
| ANEXO 1.- Representación esquemática de los sitios de unión del factor de transcripción STAT en la secuencia de la construcción <i>dpp-lacZ<sup>BS3.0</sup></i> ..... | 134 |
|---|-----|

|  |     |
|--|-----|
| ANEXO 2.- Efectos de la sobre-expresión de Dp53 en el ala con las diferentes líneas GAL4 utilizadas..... | 135 |
|--|-----|

|   |  |
|---|--|
| ANEXO 3.- Altos niveles de Dp53 inducen la activación de la vía |  |
|---|--|

|  |     |
|--|-----|
| JNK.....   | 136 |
| ANEXO 4.- Efecto de la sobre-expresión de Dp53 en la expresión de Cut, bantam-sensor y m8-lacZ y en la formación del borde D/V del disco imaginal de ala.....  | 137 |
| ANEXO 5.- Publicaciones: González, I., <u>Simón, R.</u> and Busturia, A. (2009). The Polyhomeotic protein induces hyperplastic tissue overgrowth through the activation of the JAK/STAT pathway. Cell Cycle 8:24, 4103-4111..... | 138 |

## SUMMARY

---



The mechanisms controlling cellular proliferation and apoptosis are essential to animal development and survival. The Polycomb (PcG) and trithorax (trxG) groups of proteins are epigenetic regulators that play a pivotal role in the regulation of the balance between these two processes. They function by ensuring the maintenance of the repressed or activated gene transcriptional states during cellular proliferation. Moreover, the p53 pathway is also instrumental in the control of the homeostatic balance between proliferation and apoptosis. In this Thesis, I have studied the effects on apoptosis and proliferation that the modulation of the levels of expression of the PcG/trxG proteins have in the development of wing imaginal discs in *Drosophila*. Furthermore, I have analyzed the mechanisms by which Dp53 induces both apoptosis and proliferation. Finally I have also studied the dRYBP interacting proteins by mass spectrometry and analyzed its function together with dKDM2, SCE/dRING and dBRE1 in the regulation of homeotic gene expression.

The conclusions of this Thesis work are the following: **1)** The modulation of the levels of expression of the PcG/trxG proteins affects the proliferation and apoptosis of the wing imaginal discs. Proteins that belong to the same protein complex have different outcomes on these processes. **2)** High levels of Polyhomeotic protein induce hyperplastic overgrowths through the activation of the JAK/STAT pathway and Wingless, dMyc and Decapentaplegic factors, accompanied by a strong induction of apoptosis and weak changes in cellular identities. **3)** Low levels of Polyhomeotic protein induce neoplastic overgrowths through the activation of the JAK/STAT pathway and Wingless and Decapentaplegic factors, accompanied by a weak induction of apoptosis and strong changes in cellular identities. **4)** Both, high and low levels of expression of dRYBP induce apoptosis in a Dp53-dependent way. **5)** *Dp53* gene interacts genetically with *Notch* and *wingless* genes. **6)** Dp53 protein regulates *Notch* expression transcriptionally, whose promoter contains Dp53 binding sites. **7)** High levels of Dp53 produce, besides apoptosis, proliferation in the wing imaginal disc. This proliferation, which could be independent of apoptosis, requires the activation of Notch and Wingless expression. **8)** The study of dRYBP-interacting proteins by mass spectrometry indicates that dRYBP interacts with a high variety of proteins, including proteins of the Polycomb and trithorax group and proteins involved in the ubiquitination process. **9)** *dRYBP* interacts genetically with *Sce/dRing*, *dkdm2* and *dBre1*. Moreover, the dRYBP, SCE/dRING, dKDM2 and dBRE1 proteins interact molecularly. Furthermore, dRYBP together with SCE/dRING and dKDM2 participates in the maintenance of transcriptional silencing mediated by the MCP element, a Polycomb Response Element (PRE), of the *Abdominal-B* gene. **10)** dRYBP, SCE/dRING, dKDM2 and dBRE1 are involved in the maintenance of homeotic gene expression to promote intermediated states of transcriptional repression and activation.





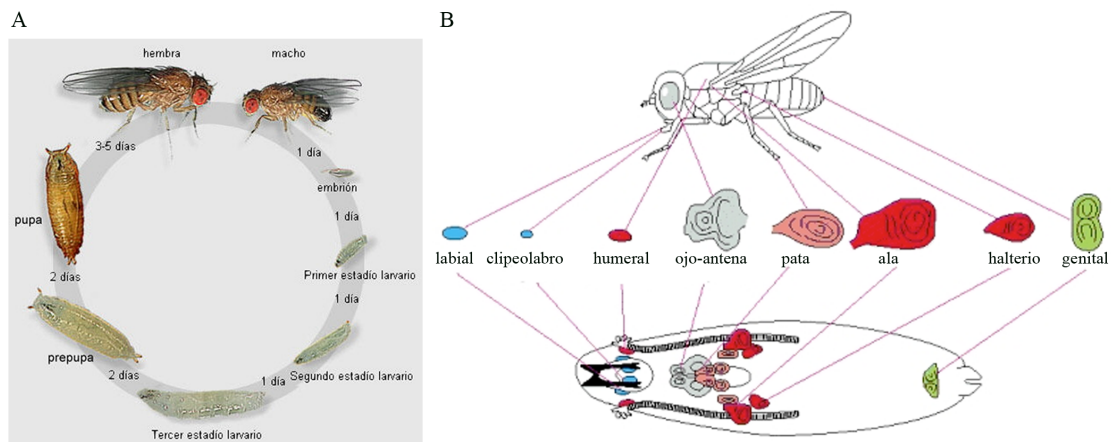
# INTRODUCCIÓN

---



## 1.1.- *Drosophila melanogaster* COMO SISTEMA MODELO PARA EL ESTUDIO DE LA BIOLOGÍA DEL DESARROLLO.

La Biología del Desarrollo estudia los mecanismos implicados en la formación de los organismos, desde el óvulo fecundado hasta la fase adulta. Más concretamente, estudia los controles genéticos y moleculares del crecimiento y la proliferación celular, la diferenciación celular y la morfogénesis. Fue hace más de un siglo, cuando Thomas Hunt Morgan introdujo *Drosophila melanogaster* como sistema modelo para el estudio de esta disciplina. La mosca *Drosophila melanogaster* es un sistema muy útil para el estudio de todos estos mecanismos, ya que posee unas características biológicas idóneas, como son su pequeño tamaño, su ciclo de vida corto, su reducido número de cromosomas y su elevada fertilidad. Asimismo, posee unos cromosomas gigantes (politénicos) en los tejidos larvarios que son de gran utilidad para estudios citogenéticos. Muy importantemente, las vías de señalización que regulan el desarrollo de esta mosca están muy conservadas en la evolución (Vidal and Cagan, 2006). Además, el uso de *Drosophila* para el estudio de los mecanismos que regulan estas vías ha promovido la generación de herramientas experimentales tanto genéticas como moleculares que no están disponibles en ningún otro sistema modelo, haciendo de este organismo un modelo biológico de elección.



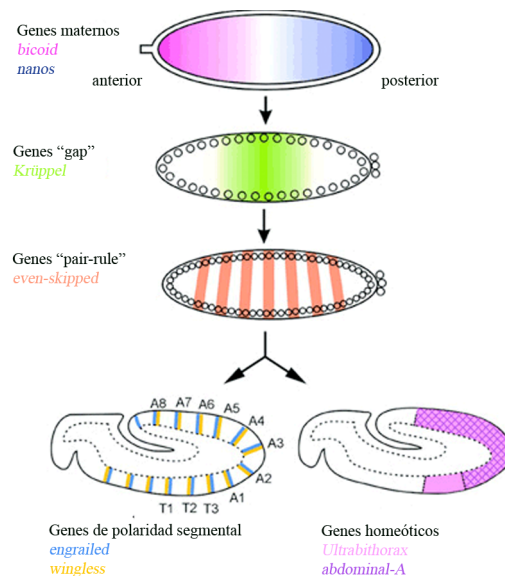
**Figura 1.- Desarrollo de *Drosophila melanogaster*.** A) Ciclo vital de *Drosophila melanogaster* (tomado de Flymove). B) Representación esquemática de los discos imaginales de *Drosophila*, su posición en la larva y las estructuras adultas a las que darán lugar tras la metamorfosis. Modificado de (Alberts, 2002).

*Drosophila melanogaster* tiene un ciclo vital de aproximadamente 10 días a 25°C en los que pasa por distintas fases (Figura 1A). La primera fase del desarrollo, la etapa embrionaria, dura aproximadamente 24 horas. Transcurrido este tiempo el huevo fecundado eclosiona y da lugar a la siguiente fase del desarrollo, la etapa larvaria. En esta etapa del desarrollo la larva permanece durante 4 días en los que pasa por tres estadios larvarios diferentes y en los cuales tiene lugar la proliferación de los discos imaginales (Figura 1B), que darán lugar a las estructuras correspondientes en el individuo adulto.

Los últimos cinco días del desarrollo de *Drosophila* se corresponden con la fase pupal en la cual tienen lugar la proliferación de los histoblastos abdominales que darán lugar al abdomen, y la metamorfosis de los discos imaginales, que producirán las estructuras adultas, así por ejemplo, los discos imaginales de ala darán lugar al ala propiamente dicha, los discos imaginales de ojo-antena a los ojos y antenas, etc. (Figura 1B). Al final de estos 10 días el individuo adulto emerge de la pupa (Figura 1A) (Ashburner, 1989).

## 1.2.- MORFOLOGÍA DEL CUERPO DE *Drosophila*.

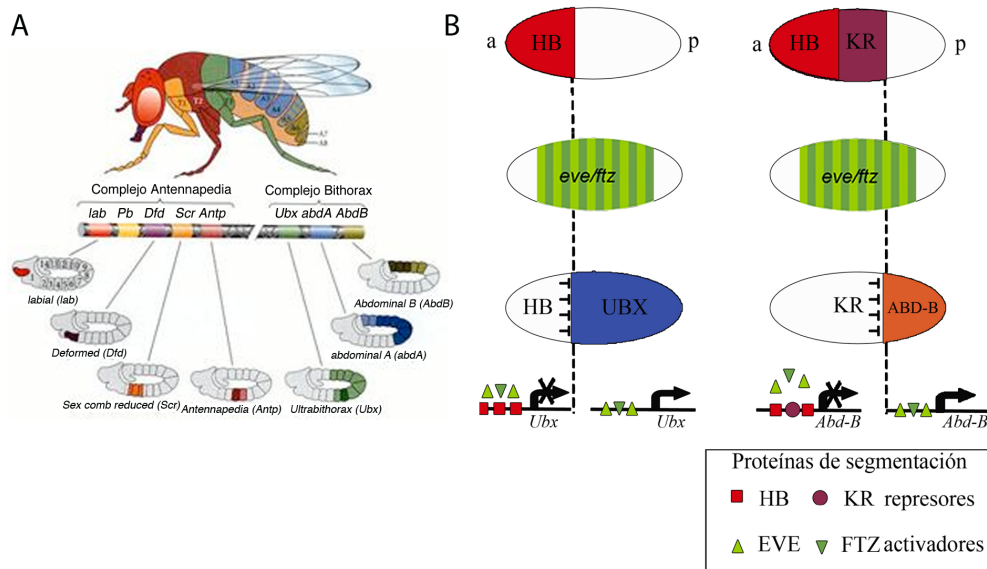
El cuerpo de *Drosophila*, como el de otros muchos organismos, está dividido en segmentos (Figura 2). El proceso de segmentación comienza muy temprano en el desarrollo y está mediado por la expresión de una serie de genes, muchos de los cuales codifican para factores de transcripción, que actúan secuencialmente durante el desarrollo del embrión. Inicialmente se establece el eje antero/posterior embrionario, que se define por la acción de los genes maternos que regulan la expresión de los genes “gap”, que a su vez controlan la expresión de los genes “pair rule” (Figura 2) (Lawrence, 1992). Los genes “pair rule” se expresan en siete bandas complementarias (Lawrence, 1992) y su actividad



**Figura 2.- Cascada de regulación génica implicada en la segmentación del embrión de *Drosophila*.** Las proteínas maternas activan la expresión diferencial de los genes “gap”, que a su vez activan la expresión de los genes “pair rule”, que activan la expresión de los genes de “polaridad segmental” y, finalmente, de forma coordinada, se activa la expresión de los genes homeóticos. Modificado de (Sanson, 2001).

combinatoria determina los valores de información posicional a lo largo del eje antero/posterior en el que se basa el patrón definitivo de catorce parasegmentos embrionarios (Figura 2). El parasegmento (PS) es la unidad metamérica funcional durante el desarrollo embrionario. Una vez establecido el número de parasegmentos, los genes de “polaridad segmental” especifican los compartimentos dentro de cada parasegmento. Así, cada parasegmento se compone del compartimento posterior de un segmento y el compartimento anterior del segmento siguiente (Martinez-Arias and Lawrence, 1985). Tanto los genes “pair rule” como los genes de “polaridad segmental” establecen los límites de expresión de los genes homeóticos, que otorgan identidad a cada uno de los segmentos (Lawrence, 1992).

Los genes homeóticos (Hox) controlan la diversidad morfológica de los segmentos del cuerpo de la mosca (Lewis, 1978), determinando las estructuras que han de formarse en cada segmento, y por tanto, definiendo su propia identidad. Por ejemplo, la expresión del gen *Ubx* en el tercer segmento torácico hace que se desarrolle un halterio, mientras que el segundo segmento torácico, en el cual no se expresa *Ubx*, desarrolla un ala. Los genes Hox codifican factores de transcripción muy conservados en la evolución que coordinan la actividad de otros genes, organizando el desarrollo del mesodermo, endodermo, tejido nervioso y epidérmico de animales tan distintos como vertebrados, moscas o gusanos (Akam et al., 1994; Krumlauf, 1994). Una de las características de los genes Hox es la co-linealidad existente entre su posición próximo-distal en el cromosoma y su expresión a lo largo del eje antero-posterior del cuerpo de la mosca (Lewis, 1978) (**Figura 3A**).



**Figura 3.- Los genes homeóticos.** **A)** Representación esquemática de la posición próximo-distal de los genes Hox en el cromosoma y sus dominios de expresión a lo largo del eje antero-posterior del cuerpo del embrión y de la mosca. **B)** Establecimiento de los límites de expresión de los genes homeóticos *Ubx* y *Abd-B*. La represión comienza por las proteínas de segmentación Hunchback (*HB*) y Krüppel (*KR*), cuya expresión es complementaria a la expresión de los genes *Ubx* y *Abd-B*, respectivamente. Para el caso del gen *Ubx*, anterior al PS5, la competición por la unión al ADN ocurre entre *HB*, como represor, y *FTZ* y *EVE*, como activadores. El resultado de esta competición es favorable a *HB* y, por consiguiente, la expresión del gen *Ubx* se reprime. Posterior al PS5, *HB* no se expresa o lo hace en niveles que no son suficientes para desplazar a los activadores y, por tanto, el gen *Ubx* se transcribe. De la misma forma ocurre con el borde de expresión de *Abd-B* en el PS10, donde se genera una competición por la unión a las regiones reguladoras entre la proteína *KR*, como represor, y *FTZ* y *EVE*, como activadores.

En *Drosophila*, los genes Hox se agrupan en dos complejos génicos: el complejo *Antennapedia* (Ant-C) y el complejo *bithorax* (BX-C) (**Figura 3A**). La acción conjunta de ambos complejos controlan el desarrollo del cuerpo (Lewis, 1978; Duncan, 1987), con excepción de la analia, controlado por el gen *caudal* (Moreno and Morata, 1999). El Ant-C está compuesto, en un orden próximo-distal respecto a su localización en el cromosoma, de los siguientes genes: *labial* (*lab*), *Proboscipedia* (*Pb*), *Deformed* (*Dfd*), *Sex combs reduced* (*Scr*) y *Antennapedia* (*Ant*) (**Figura 3A**). Estos genes especifican la identidad del

PS1 hasta el PS4 (Kaufman et al., 1990), los cuales comprenden la cabeza y los dos primeros segmentos torácicos. El BX-C está formado por tres genes, que en orden próximo-distal son: *Ultrabithorax* (*Ubx*), *abdominal-A* (*abd-A*) y *Abdominal-B* (*Abd-B*) (**Figura 3A**) (Sanchez-Herrero et al., 1985; Tjong et al., 1985). Estos genes otorgan la identidad desde el PS5 al PS14, que corresponden con el tercer segmento torácico y los ocho segmentos abdominales, y se expresan en epidermis, sistema nervioso central (SNC) y mesodermo visceral y somático (DeLorenzi et al., 1988; Celniker et al., 1989; Kornfeld et al., 1989; Zavortink and Sakonju, 1989; Karch et al., 1990).

Desde muy temprano en la embriogénesis, la expresión de los genes homeóticos se restringe a dominios específicos, mostrando un límite de expresión muy definido en una posición determinada a lo largo del eje antero-posterior del embrión. Se establece, por tanto, un dominio donde los genes homeóticos están activados y un dominio donde están reprimidos. Ambos dominios se tienen que mantener en la misma posición a lo largo del desarrollo, ya que variaciones en la expresión de los genes homeóticos en cualquier momento del desarrollo conlleva transformaciones fenotípicas severas y, en muchos casos, letalidad. Estos dominios de expresión de los genes homeóticos se establecen por los genes de segmentación (**Figura 3B**), que sólo se expresan durante las cuatro primeras horas del desarrollo (Jackle et al., 1992), mientras que los genes homeóticos se expresan y se requieren funcionalmente a lo largo de todo el desarrollo. Así pues, el mantenimiento de la expresión de los genes homeóticos durante el desarrollo es llevado a cabo por otro grupo de genes: los genes de los grupos Polycomb (PcG) y trithorax (*trxG*) (Lewis, 1978; Jurgens, 1985), siendo los primeros los responsables de mantener los estados transcripcionales reprimidos y los segundos, los encargados de mantener los estados transcripcionales activados (Kennison and Tamkun, 1988).

Las proteínas PcG/*trxG* son proteínas nucleares asociadas a cromatina que se expresan ubicuamente a lo largo del desarrollo y que actúan formando complejos multiproteicos. Actualmente, se conoce que estas proteínas regulan el mantenimiento de la expresión de una gran variedad de genes, no sólo de los genes homeóticos, implicados en múltiples procesos biológicos como hematopoiesis, mantenimiento de la pluripotencialidad de las células troncales, control de la proliferación celular y tumorigénesis (Remillieux-Leschelle et al., 2002; Ferres-Marco et al., 2006; Martinez and Cavalli, 2006; Oktaba et al., 2008; Pietersen and van Lohuizen, 2008; Probst et al., 2009). Los mecanismos por los que estas proteínas actúan están siendo muy estudiados debido a su importancia global en la regulación de la expresión génica y también, debido al importante papel que juegan en el desarrollo normal y en el desarrollo patológico de las enfermedades humanas. Los mecanismos por los que estos dos grupos de proteínas, PcG y *trxG*, regulan la expresión

génica se expondrán más adelante (ver apartado 1.4.) (revisado en (Schuettengruber et al., 2007; Schwartz and Pirrotta, 2007)).

### 1.3.- CONTROL DEL TAMAÑO DE LOS ÓRGANOS.

Como se ha descrito, durante el proceso de morfogénesis se genera el patrón morfológico de la mosca con un determinado número de órganos, como 6 patas, 2 alas, etc. La regulación del tamaño de los órganos se lleva a cabo mediante la activación y la represión de los mecanismos de proliferación que hacen que los órganos alcancen sus dimensiones apropiadas y que paren de proliferar cuando estas dimensiones han sido alcanzadas. Fallos en los procesos de regulación de la proliferación conllevan a malformaciones del patrón morfológico.

La proliferación celular comienza en la fase embrionaria, donde tienen lugar un promedio de cinco divisiones celulares para obtener un embrión adecuado en forma y tamaño (Ashburner, 1989). Durante la fase larvaria, donde tiene lugar la proliferación de las estructuras imaginales que darán lugar a las estructuras adultas, la proliferación es mucho más significativa. Por ejemplo, en el disco imaginal de ala tienen lugar unas 15 divisiones celulares (Garcia-Bellido and Merriam, 1971). Es en esta fase larvaria donde *Drosophila* se ofrece como un excelente modelo para el estudio de los mecanismos que controlan la proliferación y el tamaño de los órganos.

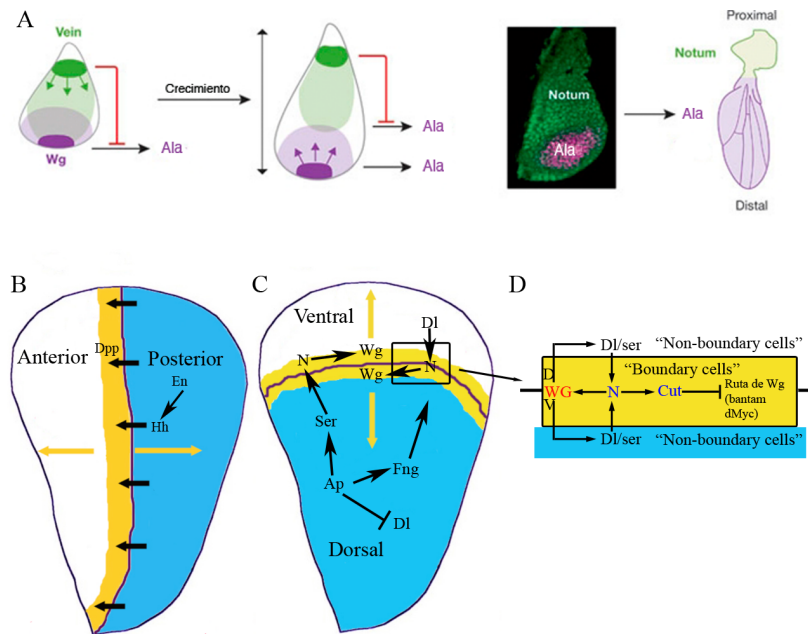
El disco imaginal de ala es el primordio que dará lugar al *notum* y al ala propiamente dicha de la mosca, que se genera a partir de un grupo de entre 30 y 40 células que proliferan para alcanzar un tamaño final de aproximadamente  $5 \times 10^4$  células (revisado en (Herranz and Milan, 2008)). La proliferación de este grupo de células está regulada por la expresión de una serie de morfógenos y factores de transcripción (revisado en (Strigini and Cohen, 1999; Cadigan, 2002)). Estos morfógenos son secretados al medio extracelular donde van a difundir en forma de gradiente desde los llamados bordes de compartimento, uniéndose a sus receptores específicos presentes en las células adyacentes para activar una cascada de señalización que en último término conlleva cambios en la expresión de sus genes diana. La formación de estos gradientes está finamente regulada en el tiempo y en el espacio para asegurar la correcta formación del patrón morfológico del tejido. Recientes evidencias experimentales apoyan la idea de que la propia proliferación del tejido contribuye a la generación de los gradientes de morfógenos, a la modulación de las respuestas celulares a estos gradientes y a la expansión de los dominios de expresión de los morfógenos y de sus genes diana (revisado en (Dekanty and Milan, 2011)).

En el primordio temprano de ala, cuando éste está formado por unas 200 células, es cuando tiene lugar la determinación entre cuáles células adquirirán identidad de ala y cuáles serán *notum*. Esta decisión viene determinada por la actividad opuesta de 2 morfógenos, Wingless (WG) y, el ligando del receptor EGFR, Vein (VN), que se expresan en la parte más ventral y dorsal del primordio de ala, respectivamente (**Figura 4A**) ((Ng et al., 1996; Zecca and Struhl, 2002) y revisado en (Dekanty and Milan, 2011)). WG induce la especificación del destino celular de ala y restringe la expresión de VN a la parte más dorsal del primordio de ala, mientras que VN antagoniza la actividad de WG induciendo la especificación del destino celular de *notum*. La proliferación de las células hace que el tejido incremente su tamaño, de modo que también se incrementa la distancia entre las fuentes opuestas de WG y VN. Consecuentemente, las células ventrales no reciben suficientes niveles de VN para bloquear la actividad de WG y, a la inversa, las células dorsales no reciben suficientes niveles de WG para bloquear la actividad de VN. De esta forma el crecimiento del tejido controla la especificación de destino celular modulando la exposición de las actividades de los morfógenos a las células receptoras.

Al final del segundo estadio larvario, el primordio de ala se subdivide en compartimentos: el compartimento anterior (A), el posterior (P), el dorsal (D) y el ventral (V) (**Figura 4B-D**). Aunque el destino A/P ya viene especificado desde la etapa embrionaria. Estos compartimentos están formados por poblaciones adyacentes de células que no se mezclan durante la proliferación, es decir, son bloques de células independientes. Los llamados bordes de compartimento se comportan como centros organizadores del crecimiento durante el desarrollo tardío del primordio de ala. Por un lado, la formación del borde antero/posterior (A/P) está dirigida por la expresión del gen *engrailed* en el compartimento posterior del disco imaginal (Brower, 1986; Hidalgo, 1994). Esta expresión diferencial del gen *engrailed* produce la activación del morfógeno *Decapentaplegic* (DPP) en el borde A/P (**Figura 4B**) (Hidalgo, 1994; Sanicola et al., 1995). DPP difunde desde el borde induciendo la activación/represión de una serie de genes en las células adyacentes, lo que produce la proliferación celular de las células del disco (Posakony et al., 1990). Por otro lado, la expresión del factor de transcripción *Apterous* (AP), controlada por VN, define el compartimento dorsal del disco imaginal de ala (Diaz-Benjumea and Cohen, 1993; Blair et al., 1994). La confrontación entre células dorsales y ventrales produce la activación de la ruta de señalización de Notch en el borde dorso/ventral (D/V) (**Figura 4C**) (de Celis et al., 1996). Esta ruta de señalización activa distintas proteínas entre las que se encuentra el morfógeno WG (**Figura 4D**) (Neumann and Cohen, 1996), que desde el borde D/V induce la proliferación de las células adyacentes al mismo a través de la activación de sus genes diana como *Vestigial* (Zecca et al., 1996; Neumann and Cohen, 1997). Luego WG tiene un importante papel en el desarrollo del primordio de ala, tanto en la especificación



temprana del destino celular de ala como en el crecimiento organizado del ala a partir del borde D/V y dependiente de la activación de la ruta de Notch.

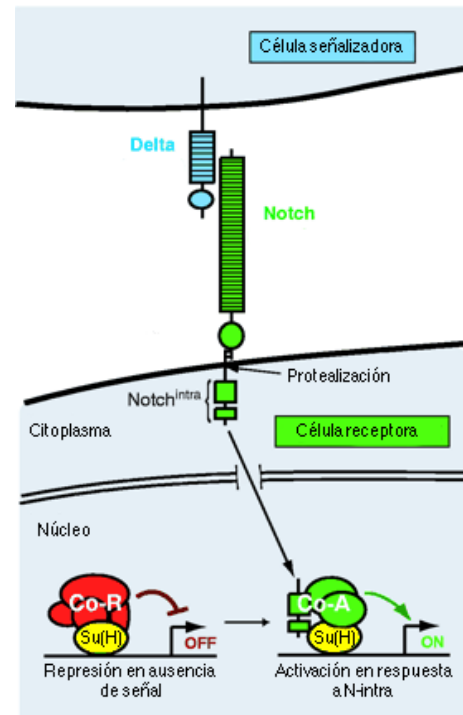


**Figura 4.- Desarrollo del disco imaginal de ala.** **A)** Representación esquemática de cómo el crecimiento modula la respuesta de las células a los morfógenos. Ver texto. Modificado de (Dekanty and Milan, 2011). **B)** Formación del borde antero/posterior mediado por las proteínas Engrailed (En) y Hedgehog (Hh), donde se expresa el morfógeno DPP. **C)** Formación del borde dorso/ventral (D/V) mediado por la ruta de señalización de Notch (N) y Wingless (Wg). La expresión restringida de la proteína Apterous (Ap) en las células dorsales subdivide el ala en el compartimento dorsal y ventral. Las interacciones entre células dorsales y ventrales resultan en la activación de Notch a lo largo del borde D/V. Apterous induce la expresión de Fringe (Fng) y Serrate (Ser), el ligando de Notch, en células dorsales y restringe la expresión de Delta (Dl), otro ligando de Notch, a las células ventrales. Las células dorsales expresando Delta y las células ventrales expresando Serrate activan Notch en el borde dorso/ventral, que induce la expresión de Wingless y la expresión de Cut en estas células. **D)** Ruta de señalización de Notch en el borde D/V. La expresión de la proteína Notch en las "boundary cells" viene determinada por Delta y Serrate, la activación de ésta da lugar a la activación del morfógeno Wg y el factor de transcripción CUT. El morfógeno Wg difunde desde el borde D/V, dando lugar a la formación de la zona denominada "non-boundary cells".

Además de las rutas de señalización de DPP, Notch y WG, existen otras muchas vías que controlan la proliferación y, también, la muerte celular, que intervienen en la morfogénesis de *Drosophila*, como la vía EGF, FGF, Hh, Hippo, JAK/STAT, RTK y TGF- $\beta$  (Gerhart, 1999). A continuación, se describirán de forma más detallada las vías de señalización que son objeto de estudio de este trabajo de Tesis, como son: la vía de señalización mediada por el receptor Notch, la vía JAK/STAT y los mecanismos que regulan la vía de la apoptosis en el desarrollo normal y en condiciones de estrés celular. Finalmente, se describirán los mecanismos de la regulación epigenética mediada por las proteínas Polycomb y trithorax.

## 1.3.1.- La vía de señalización de Notch

La vía de señalización mediada por el receptor transmembrana Notch está involucrada en el desarrollo de la mayoría de los tejidos y los órganos, con una gran variedad de efectos en la especificación de destino celular, proliferación y muerte celular (revisado en (Lai, 2004; Bray, 2006)). Esta vía de señalización y los componentes de la misma están filogenéticamente conservados. Su activación se inicia cuando el ligando presente en una célula activa al receptor transmembrana Notch de la célula receptora adyacente. Las proteínas que funcionan como ligandos del receptor Notch son las proteínas transmembrana Delta y Serrate. Tanto el receptor Notch como sus ligandos, Delta y Serrate, contienen en sus dominios extracelulares (N-terminal) varias repeticiones EGF (Epidermal Growth Factor), de las cuales se sabe que hay unas repeticiones específicas que median el contacto directo entre ligando y receptor (Rebay et al., 1991). Una vez establecida la interacción ligando-receptor, Notch tiene que ser procesado proteolíticamente en su dominio intracelular (C-terminal) para su activación funcional, liberándose el fragmento Notch-intra, el cual migra al núcleo de la célula receptora, donde forma un heterodímero con el factor de transcripción Supresor of Hairless (Su(H)). Este complejo heterodimérico recluta otros co-activadores para activar a sus genes diana, entre los que se encuentran los genes del complejo *Enhancer of split (E(spl))*. En ausencia de señal activadora, Su(H) se encuentra en el núcleo asociado a co-represores manteniendo la expresión de los genes diana inactiva. En la **Figura 5** se muestra una representación esquemática de la vía de señalización de Notch.



**Figura 5.- Vía de señalización de Notch en *Drosophila melanogaster*.** La vía se activa a través de la unión del ligando Delta con el receptor Notch presente en la célula adyacente, tras lo cual tiene lugar el procesamiento proteolítico de Notch para su activación funcional, liberándose el fragmento intracelular Notch<sup>intra</sup>, el cual se transloca al núcleo. Notch<sup>intra</sup> desplaza el complejo co-represor, que se encuentra junto con Su(H) (Suppressor of Hairless) reprimiendo los targets de la vía de Notch. Como consecuencia se recluta el complejo co-activador que junto con Notch<sup>intra</sup> y Su(H) median la activación de los genes diana. Modificado de (Lai, 2004).

La función de la vía de señalización de Notch más estudiada, y la primera bien conocida, fue su papel en neurogénesis tanto en moscas como en vertebrados (Artavanis-Tsakonas et al., 1999), en la restricción de destino de las células nerviosas mediante el

proceso conocido como inhibición lateral, en el que una célula ubicada dentro de un grupo de células en estados de desarrollo y especialización equivalentes, actúa como célula de decisión primaria y evita que sus vecinas sigan la misma ruta de diferenciación (Nakao and Campos-Ortega, 1996). Los procesos de inhibición lateral y diversificación celular que son iniciados por la expresión de genes proneurales y mediados por Notch han demostrado ser cruciales en la formación de patrones morfológicos en una gran variedad de tejidos (músculo, intestino, corazón), en los que se requieren mezclas equilibradas de diferentes tipos celulares (Hartenstein et al., 1992).

Otra de las funciones de Notch bien conocidas, es la de inhibir la proliferación celular una vez el disco imaginal de ala ha alcanzado su tamaño final, momento en el que las células que forman parte del mismo tienen que parar de proliferar. La activación de Notch en el borde D/V induce la activación del factor de transcripción CUT, que inhibe la proliferación celular al inhibir la expresión del gen *dMyc* y del microARN *bantam*, los cuales participan activamente en el crecimiento del disco imaginal de ala (**Figura 4D**) (Micchelli et al., 1997). La parada del ciclo celular en el borde dorso/ventral es uno de los puntos de regulación del crecimiento del disco imaginal de ala (Herranz and Milan, 2008).

Estudios en el ala de *Drosophila* revelaron que la falta de función de Notch impide el crecimiento celular y que su sobre-expresión (fuera del borde D/V) induce sobrecrecimientos hiperplásicos (Djiane et al., 2013), parcialmente debidos a la activación de Wingless y Vestigial, si bien este exceso de proliferación celular es independiente de la formación del borde D/V (Go et al., 1998; Baonza and Garcia-Bellido, 1999; Giraldez and Cohen, 2003), indicando que Notch tiene un papel relevante en el control de la proliferación. En mamíferos, la desregulación de la vía de Notch está asociada con la aparición de cáncer, como por ejemplo, en cánceres epiteliales y hematológicos (Curry et al., 2005; Haruki et al., 2005). Además, la interacción de la vía de Notch con otras vías oncogénicas, como la vía de Wnt (Wingless en *Drosophila*), refuerzan el papel que desempeña esta vía en tumorigénesis (Osipo et al., 2008; Pannequin et al., 2009). La vía de Notch también interacciona con vías que regulan la apoptosis en la ontogénesis del cáncer, como es el caso de la apoptosis inducida por el gen supresor de tumores *p53* (Dotto, 2009).

Por ello, una correcta regulación de la vía de señalización de Notch es muy importante para evitar el desarrollo de enfermedades. La regulación de la vía de Notch es compleja. Una de las formas de regulación más importante es a través de la modulación de la interacción entre los ligandos y el receptor, mediante modificaciones post-traduccionales, como proteólisis, ubiquitinación y glicosilaciones ((Haines and Irvine, 2003;

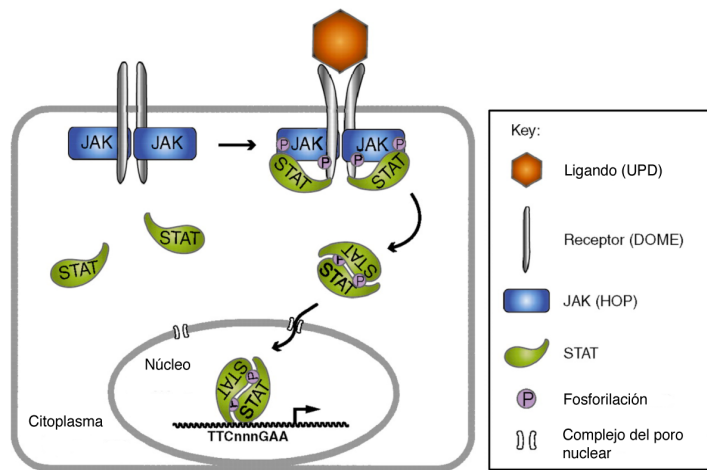
Le Borgne et al., 2005; Chitnis, 2006) y revisado en (Lai, 2002)). Otros puntos de regulación de la vía son: la localización subcelular de los ligandos (Escudero et al., 2003), el tráfico vesicular de Notch (Jekely and Rorth, 2003; Lu and Bilder, 2005) y modificaciones epigenéticas tanto del gen *Notch* como de otros componentes de la vía (Armstrong et al., 2005; Bray et al., 2005).

### 1.3.2.- La vía de señalización de JAK/STAT

La vía de señalización JAK/STAT es otra de las vías implicadas en proliferación celular, y juega un papel muy importante en la regulación del sistema inmune y en el mantenimiento de las células troncales pluripotentes (revisado en (Arbouzova and Zeidler, 2006)), y además se ha encontrado desregulada en algunos cánceres (Bowman et al., 2000). Esta ruta de señalización es activada por las citoquinas Unpaired (UPD, UPD2 y UPD3) que son los ligandos de la vía. El gen *outstretched* (*os*) codifica para la citoquina UPD. Una vez el ligando se une al receptor, Domeless (DOME), éste dimeriza y se asocia a proteínas JAK (*Janus kinase*), una familia de tirosina-quinasa (codificadas por el gen *hopscotch* (*hop*)), que a su vez reclutan y fosforilan a la proteína STAT92E, que se encuentra libre en el citoplasma, activándola. Una vez fosforilada, STAT92E se transloca al núcleo para activar la expresión de sus genes diana. La **Figura 6** muestra de forma esquemática los distintos componentes de la vía canónica de JAK/STAT en *Drosophila*.

Gracias a diversos estudios realizados en *Drosophila*, se han identificado múltiples procesos que tienen lugar durante el desarrollo embrionario, larvario y del adulto, en los que se requiere la participación de esta vía de señalización (revisado en (Hombria and Brown, 2002)), entre ellos, la proliferación celular. Por ejemplo, se encontró un fuerte requerimiento de la vía JAK/STAT durante las etapas tempranas del desarrollo larvario al hacer clones de falta de función de STAT92E en discos imaginales de ala de larvas de primer estadio y comprobar que estos clones crecían más despacio que los clones control. Curiosamente, también se observó que los clones mutantes inducidos en larvas de tercer estadio proliferaban más deprisa que los clones control, indicando que STAT92E tiene un papel anti-proliferativo en esta etapa del desarrollo (Mukherjee et al., 2005).

A pesar de que la activación de la señalización de la vía JAK/STAT parece ser necesaria y suficiente para modular la proliferación celular en diversos contextos celulares, como en el ala (Mukherjee et al., 2005), no se conoce todavía el mecanismo exacto por el que esta vía regula la división celular (Chen et al., 2003).



**Figura 6. Cascada de señalización JAK/STAT en *Drosophila melanogaster*.** La vía es activada por la citoquina Unpaired (UPD), codificada por el gen *outstretched* (*os*), que se une al receptor *Domeless* (DOME), el cual dimeriza y se asocia a proteínas JAK, tirosina-quinasas (codificadas por el gen *hopscotch*), que a su vez reclutan y fosforilan a la proteína STAT92E, que se encuentra libre en el citoplasma, activándola y permitiendo su translocación al núcleo donde activará a sus genes diana. Modificado de (Arbouzova and Zeidler, 2006).

En cuanto a la regulación de la vía de señalización JAK/STAT, ésta es regulada a múltiples niveles tanto positiva como negativamente, no sólo a través de la unión del ligando, sino también a través de la interacción con otras cascadas de señalización y con otras moléculas. Un ejemplo de regulación de la vía JAK/STAT a través de su interacción con otras vías se encuentra en el disco imaginal de ojo de *Drosophila*, donde se ha visto que la vía de señalización de Notch, anteriormente descrita, activa la ruta de JAK/STAT induciendo la expresión de UPD (Chao et al., 2004; Reynolds-Kenneally and Mlodzik, 2005). Además, diversos estudios genéticos han identificado diferentes interacciones entre los componentes de la vía JAK/STAT y componentes de las vías de señalización de DPP y Hh (Bach et al., 2003; Mukherjee et al., 2006). Así, por ejemplo, se ha encontrado que la vía de JAK/STAT regula positivamente la vía de DPP en las células madre germinales del ovario de *Drosophila* (Lopez-Onieva et al., 2008; Wang et al., 2008).

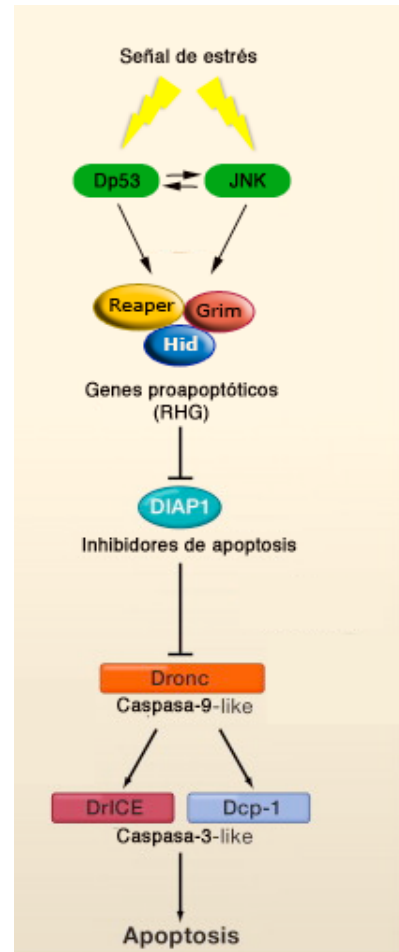
### 1.3.3.- Mecanismos de regulación de la apoptosis

La muerte celular programada o apoptosis tiene lugar en todos los organismos pluricelulares y su correcta regulación es fundamental para el correcto desarrollo de los mismos. Fallos en la regulación de este proceso se encuentran en todo tipo de cánceres humanos (Bourdon et al., 2005; Amensen et al., 2006; Marcel et al., 2009; Hofstetter et al., 2010; Bourdon et al., 2011). La apoptosis tiene dos funciones fundamentales durante el desarrollo y la vida de los individuos adultos, tanto en la morfogénesis de estructuras corporales como en la eliminación de células que supongan una amenaza para la integridad del organismo.

La maquinaria de muerte celular en *Drosophila* está conservada filogenéticamente y está determinada por la acción de una serie de proteínas proapoptóticas, como las proteínas Rpr (Reaper), Hid (Head Involution Defective) y Grim (recientemente revisado en (Fuchs and Steller, 2011)). Tanto en moscas como en vertebrados el núcleo de la maquinaria de muerte celular está constituido por las caspasas, miembros de una familia de proteasas, que se expresan en todas las células y que se activan en respuesta a señales de muerte, proteolizando sustratos celulares que en última instancia promueven la muerte de la célula y su fagocitosis (Figura 7). Las caspasas pueden clasificarse en caspasas iniciadoras, como la caspasa Dronc (*Drosophila* Nedd-2-like Caspase) (homóloga a la Caspasa-9 en vertebrados), capaces de autoactivarse y, en caspasas efectoras, como las caspasas DCP-1 (Death Caspase-1) y DRICE (*Drosophila* ICE) (homólogas a la Caspasa-7 y Caspasa-3, respectivamente, en vertebrados), que son activadas por las caspasas iniciadoras.

La activación de las caspasas iniciadoras puede darse por dos vías diferentes: 1) La vía extrínseca, que es inducida por la unión de un ligando a un receptor de muerte celular del tipo TNF (Tumor Necrosis Factor) (Guicciardi and Gores, 2009); 2) La vía intrínseca, que implica la mitocondria y conduce siempre a la liberación, al citosol, del citocromo c, que desencadena la formación del apoptosoma, y con él, la activación de las caspasas iniciadoras (revisado en (Fuchs and Steller, 2011)).

Las señales extracelulares o estímulos que van a activar la cascada apoptótica intrínseca en *Drosophila* pueden ser muy variados e incluyen señales de estrés, como daño en el ADN, que van a activar al gen *Dp53* que tiene como diana al gen pro-apoptótico *rpr* (Brodsky et al., 2000). Los genes *rpr*, *hid* y *grim* (RHG) son genes diana de numerosos factores de transcripción; además del gen *Dp53*, están los genes de segmentación, los



**Figura 7. Ruta de regulación de la apoptosis en *Drosophila melanogaster*.** En respuesta a una señal de estrés, la vía JNK y Dp53 se activan para, a su vez, activar a los genes pro-apoptóticos *rpr*, *hid* y *grim* (RHG), que inhiben a las proteínas inhibidoras de apoptosis (DIAPs), permitiéndose así la activación de la caspasa iniciadora Dronc, y la activación de las caspasas efectoras Dcp-1 y Drice, que son las proteínas efectoras de la muerte celular. Modificado de (Fuchs and Steller, 2011).

genes *Hox*, los genes del grupo *Polycomb* y genes que participan en las vías de señalización de Notch, Dpp y JNK, entre otros (revisado en (Fuchs and Steller, 2011)) (Figura 7).

### 1.3.3.1.- Mecanismos de inducción de apoptosis mediados por la proteína P53

Entre los mecanismos que controlan la muerte celular en situaciones de estrés para la célula, la proteína P53 juega un papel muy relevante, actuando como principal regulador negativo de la proliferación mediante la inducción de apoptosis para mantener la homeostasis de los organismos. La mayoría de los tumores humanos presentan mutaciones en el gen *p53* o defectos funcionales en su vía de señalización, poniendo de relevancia su importancia para prevenir la tumorigénesis (Hollstein et al., 1991). Estudios realizados en ratón mostraron que *p53* era dispensable para el desarrollo normal de los individuos, sin embargo, los ratones que portaban mutaciones homocigóticas para *p53*, aunque de apariencia eran normales, quedaban predispuestos a desarrollar tumores neoplásicos tras 6 meses de vida (Donehower et al., 1992).

La proteína P53 contiene varios dominios, entre los que destaca su dominio de unión a ADN que le permite actuar como un factor de transcripción. En condiciones normales, los niveles de expresión del ARNm de *p53* se mantienen constantes; sin embargo, los niveles de la proteína P53 en la célula son bajos debido a la acción de una serie de E3-ubiquitin ligasas, siendo la más importante la proteína MDM2 (Mouse Double Minute 2), que modifica post-traduccionamente a P53 mediante su ubiquitinación en la lisina K48 y la manda a degradación vía proteasoma (revisado en (Kruse and Gu, 2009; Love and Grossman, 2012)). En condiciones de estrés celular la interacción entre la proteína MDM2 y P53 no tiene lugar, de modo que no se produce su ubiquitinación, por lo que los niveles de expresión de P53 son estabilizados y aumentan rápidamente, y por tanto, P53 es capaz de activar transcripcionalmente a sus genes diana, entre ellos los genes pro-apoptóticos, que van a mediar los procesos de parada del ciclo celular e inducción de apoptosis (Brodsky et al., 2000; Vousden and Lane, 2007; Green and Kroemer, 2009).

En *Drosophila*, sólo hay un gen ortólogo, el gen *Dmp53*, que codifica para 2 isoformas proteicas mayoritarias: Dp53 (proteína completa) y DΔNp53 (proteína truncada en el dominio N-terminal) (revisado en (Marcel et al., 2011)). La estructura de la proteína Dp53 está conservada, incluyendo los dominios de unión al ADN. De forma similar a lo que ocurre en mamíferos, moscas mutantes para *Dmp53* son viables y fértiles (Brodsky et al., 2004). Importantemente, la función pro-apoptótica de Dp53 está bien conservada en



*Drosophila* (Xu et al., 2009). Sin embargo, *Dmp53* no parece tener la capacidad de inducir parada del ciclo celular en respuesta a estrés por radiación como ocurre en mamíferos (Brodsky et al., 2000; Ollmann et al., 2000; Brodsky et al., 2004). Se sabe que la principal isoforma implicada en apoptosis parece ser la isoforma DΔNp53, que regula directamente la expresión del gen *rpr* (Brodsky et al., 2000) y que, además, induce la expresión de *Wingless* dependientemente de *Dronc* (Marcel et al., 2011; Dichtel-Danjoy et al., 2013).

### 1.4.- REGULACIÓN EPIGENÉTICA DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIADA POR LA PROTEÍNAS DE LOS GRUPOS POLYCOMB (PcG) Y TRITHORAX (trxG)

Los genes PcG (**Tabla 1**) son requeridos para el mantenimiento de los estados transcripcionales reprimidos, mientras que los genes trxG (**Tabla 2**) son requeridos para el mantenimiento de los estados activados. Estos genes y las proteínas para las que codifican, que actúan formando complejos multiméricos (**Tablas 1 y 2**), están conservadas en la evolución y regulan la expresión de muchos genes, entre ellos los genes Hox, alterando su estado cromatínico mediante la modificación covalente y post-traducciona l de las histonas. Por ejemplo, la mono-ubiquitinación de la Histona H2A mediada por proteínas PcG está involucrada en los mecanismos de represión génica (Wang et al., 2004; Cao et al., 2005; Gutierrez et al., 2012), mientras que la mono-ubiquitinación de la histona H2B mediada por proteínas trxG está involucrada en los mecanismos de activación génica (Henry et al., 2003; Hwang et al., 2003; Espinosa, 2008).

Se sabe que, en *Drosophila*, estas proteínas reconocen sus genes diana por la presencia en su secuencia de los denominados Polycomb Response Elements (PREs) y Trithorax Response Elements (TREs) existentes en su secuencia génica (**Figura 8**) (Simon et al., 1993). Los PREs/TREs son secuencias de ADN de unas 100-300 pb que pueden estar cerca o lejos de los promotores, a los que se unen las proteínas Polycomb y/o trithorax y marcan los genes específicos sobre los que deben actuar (Chiang et al., 1995; Horard et al., 2000; Mishra et al., 2001). Loci complejos como los homeóticos, están regulados por distintos PREs y TREs. Uno de los PREs identificados en el gen *Abd-B* es el elemento MCP, localizado entre las regiones cis-reguladoras *iab4* e *iab5* de dicho gen, que mantiene la secuencia activadora específica del PS10 del dominio cis-regulador *iab5* reprimida en el PS9 (Busturia and Bienz, 1993; Busturia et al., 1997), y que se utiliza en esta Tesis como herramienta para el estudio de los factores involucrados en el mantenimiento transcripcional de la expresión génica. El estudio de estas secuencias ha revelado que las acciones llevadas a cabo por las proteínas PcG/trxG, que en un principio son opuestas, se realizan de una forma coordinada. En muchos casos las secuencias de los PREs solapan con las de los TREs (Tillib et al., 1999), lo que implica que en numerosas



ocasiones las proteínas PcG y trxG comparten sitios de interacción génica (Strutt et al., 1997; Orlando et al., 1998; Tillib et al., 1999). Este solapamiento podría facilitar las interacciones entre las proteínas PcG y trxG, o bien reflejar la utilización de factores en común para ejercer sus funciones.

| Proteína <i>Drosophila</i>                            | Complejo                | Homólogo en humanos                     | Dominios funcionales       | Actividad Bioquímica                                 |
|---|-------------------------|---|----------------------------|--|
| Polycomb (PC)   | PRC1                    | CBX2, 4, 6, 7 y 8                       | Cromodominio               | Une H3K27me3   |
| Polyhomeotic (PH)                                     | PRC1                    | PHC1,2 y 3                              | Zn finger, SAM             |  |
| Posterior sex comb (PSC)                              | PRC1/dRAF               | PCGF1(NSPc1), PCGF2(MEL18), PCGF4(BMI1) | Zn finger                  | Cofactor para dRING                                  |
| Suppressor of zeste 2 [SU(Z)2]                        | PRC1-associated factors | BMI1, MEL-18                            | RING Zn finger             |  |
| dRING/Sex combs extra (SCE)                           | PRC1/dRAF               | RING1A, RING1B, RNF2                    | RING Zn finger             | H2AK119 ubiquitin-ligasa                             |
| Sex comb on midleg (SCM)                              | PRC1-associated factors | SCMH1, SCML2                            | Zn finger, SAM, MBT        | Recluta proteínas PcG                                |
| Enhancer of zeste [E(z)]                              | PRC2                    | EZH1y 2                                 | SET                        | H3K9 y H3K27 metil-transferasa                       |
| Extra sex combs (ESC)                                 | PRC2                    | EED                                     | Repeticiones WD40          | Cofactor para E(z)                                   |
| Suppressor of zeste 12 [SU(Z)12]                      | PRC2                    | SUZ12                                   | Zn Finger                  | Cofactor para E(z)                                   |
| Polycomb-like (PCL)                                   | PRC2-associated factors | PCL1(PHF1), PCL2(MTF2), PCL3(PHF19)     | PHD                        |  |
| Extra sex comb-like (ESCL)                            | PRC2-associated factors | EED                                     | Repeticiones WD40          | Cofactor para E(z)                                   |
| SIR2  | PRC2-associated factors | SIRT1                                   | Zn finger                  | Histona de-acetilasa dependiente de NAD <sup>+</sup> |
| Pleiohomeotic (PHO)                                   | PhoRC                   | YY1 y 2                                 | Zn finger                  | Une ADN  |
| Pho-like (PHOL)                                       | PhoRC                   | YY1 y 2                                 | Zn finger                  | Une ADN  |
| Scm-related gene containing Four Mbt domains (dSFMBT) | PhoRC                   | L3MBTL2, MBTD1                          | MBT, SAM                   | Une H3K9me1 y me2 y H4K20me1 y me2                   |
| Calypso/dBAP1   | PR-DUB                  | BAP1                                    | UCH                        | De-ubiquitina H2AK119                                |
| Additional sex comb (ASX)                             | PR-DUB                  | ASXL1                                   |                            | Cofactor para dBAP1                                  |
| dKDM2   | dRAF                    | KDM2B, FBXL10                           | CXXC Zn finger, JmjC, Fbox | H2AK119 ubiquitin-ligasa, H3K36me2 de-metilasa       |

**Tabla 1.- Composición proteica de los complejos PcG en *Drosophila melanogaster*.**

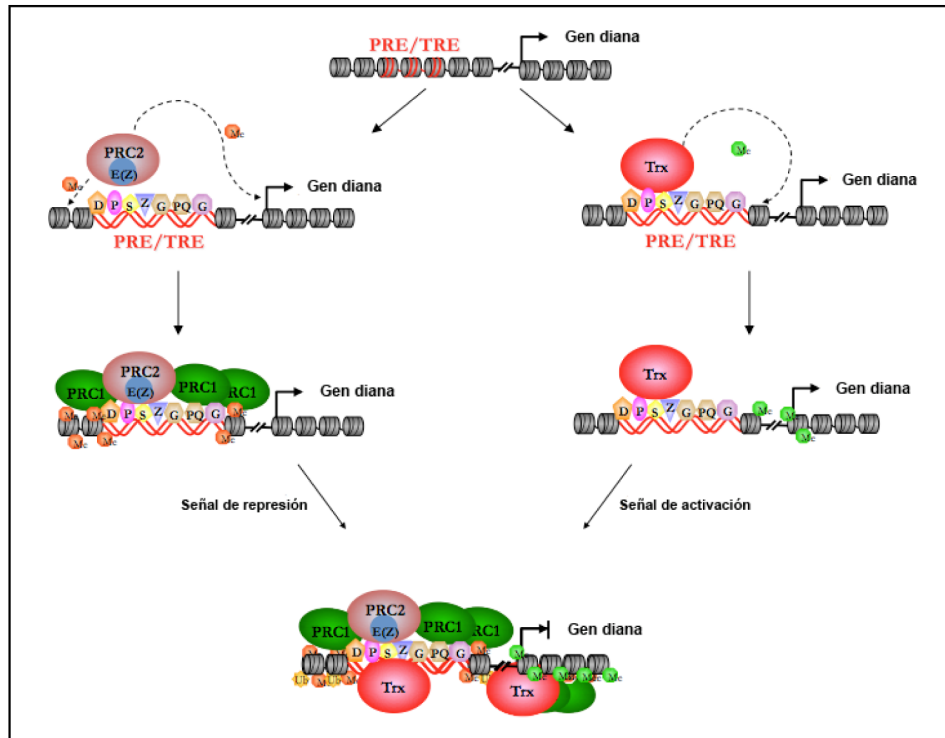
A pesar de que varias proteínas tienen dominios de unión a ADN, solo unas pocas son capaces de unirse a secuencias específicas de ADN, tal es el caso de la proteína Pleiohomeotic (PHO) que forma parte del complejo PhoRC (**Tabla 1**) (Brown et al., 1998; Fritsch et al., 1999; Brock and Fisher, 2005). El modelo más simple para explicar el reclutamiento de estos complejos multiproteicos a los PREs/TREs postula que uno o varios factores de unión al ADN, se unan directamente a la secuencia del PRE/TRE, siendo de este modo, los responsables de la interacción con el resto de las proteínas PcG y trxG (**Figura 8**) (Klymenko et al., 2006) (revisado en (Muller and Kassis, 2006; Schuettengruber et al., 2007)). Las evidencias experimentales apuntan a que, durante la replicación, los complejos represores/activadores señalizan mediante una modificación

covalente en las histonas el re-establecimiento de dichos complejos y, por tanto, aseguran el mantenimiento de los estados transcripcionales reprimidos o activados (“memoria celular”). Las modificaciones encontradas hasta el momento, incluyen la metilación, la acetilación, la fosforilación y la ubiquitinación (Wang et al., 2004; Bhaumik et al., 2007) de las histonas. La relación entre activación y represión respecto a las distintas modificaciones no esta muy bien establecida ya que por ejemplo la acetilación de las distintas lisinas (K) de las histonas puede llevar a una activación o a una represión, dependiendo de cual de ellas se modifique.

| Proteína <i>Drosophila</i>                    | Complejo     | Homólogo en humanos | Dominios funcionales                      | Actividad Bioquímica                            |
|---|--------------|---------------------|---|---|
| Trithorax (TRX)                               | TAC1/COMPASS | MLL, MLL2, 3 y 5    | SET                                       | H3K4me3 metil-transferasa                       |
| dCBP  | TAC1         | CBP                 | Zn finger, KIX<br>IBiD                    | Acetil-transferasa                              |
| dUTX  | TAC1         | UTX                 | JmjC                                      | H3K27me3 y me2<br>de-metilasa                   |
| Absent, small o<br>homeotic discs 1<br>(ASH1) | TAC1/COMPASS | ASH1L               | SET                                       | H3K4/H3K36<br>metilasa                          |
| Absent, small o<br>homeotic discs 2<br>(ASH2) | TAC1         | ASH2L, WRD5         | Repeticiones<br>WD40                      | Esencial para<br>H3K4me3                        |
| Brama (BRM)                                   | SWI-SNF      | BRM, BRG1           | Bromodominio,<br>SWI-SNF-like<br>helicasa | Actividad ATPasa,<br>une histonas<br>acetiladas |
| Moir (MOR)                                    | SWI-SNF      | SMARCC2, BAF17A     |   |   |
| Osa (OSA)                                     | SWI-SNF      | ARID1A, BAF250      |   |   |
| Snf5-related 1<br>(SNR1)                      | SWI-SNF      | SNF5, ARID4A/B      |   |   |
| dSET1   | COMPASS      | SET1                | SET                                       | H3K4 metilasa                                   |
| Trithorax-related<br>(TRR)                    | COMPASS      |                     | SET                                       | H3K4 metilasa                                   |
| dBRE1   | dBRE1-RAD6   | BRE1                | RING Zn finger                            | H2B ubiquitin-ligasa                            |

**Tabla 2.- Composición proteica de los complejos trxB en *Drosophila melanogaster*.**

Las proteínas PcG/trxB poseen diversos dominios funcionales y actúan formando complejos proteicos multiméricos (revisado en (Muller and Verrijzer, 2009)). Los complejos PcG mejor caracterizados son los complejos PRC1 (Polycomb Repressive Complex 1) (Shao et al., 1999), PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2) (Czermin et al., 2002; Muller et al., 2002), PhoRC (Pleihomeotic Repressive Complex) (Klymenko et al., 2006), PR-DUB (Polycomb Repressive Deubiquitinase) (Scheuermann et al.) y dRAF (dRING Associated Factors) (Lagarou et al., 2008) (**Tabla 1**). En cuanto a las proteínas trxB se han identificado varios complejos: TAC1 (TriThorax Acetilation Complex 1) (Petruk et al., 2001), SWI-SNF (Switch/Sucose Non-Fermenting) (Smith and Peterson, 2005) y dCOMPASS (Complex of Proteins Associated with Set1) (Mohan et al., 2011) (**Tabla 2**). Cada complejo proteico contiene asociada una actividad bioquímica específica, como por ejemplo, la mono-ubiquitinación de la histona H2A catalizada por el complejo PRC1. A continuación se describen los complejos PcG/trxB que son importantes para el desarrollo de esta Tesis.



**Figura 8. Reclutamiento de las proteínas PcG y trxG a los PREs/TREs.** Las proteínas PcG se unen a los PRE (Polycomb Response Elements) y promueven la modificación post-traduccional de las histonas, como la metilación (Me) de las lisinas K9 y K27 de la H3 produciendo represión. Por otro lado, las proteínas trxG se unen a los TRE (Trithorax Response Elements) promoviendo la modificación post-traduccional de las histonas, como la metilación (Me) de las lisinas K4 y K9 de la H3 y de la lisina K20 de la H4, que en este caso produce activación.

#### 1.4.1. Complejos PcG y sus actividades bioquímicas

El núcleo del complejo PRC1 está constituido por 4 proteínas que incluyen: Polycomb (PC), Polyhomeotic (PH), Posterior sex comb (PSC) y Sex comb extra (SCE/dRING). La inclusión de la proteína Zeste en el complejo hace que aumente la actividad de represión de la remodelación de la cromatina así como la unión por sitios específicos reconocidos por Zeste que se encuentran en los PRE (Mulholland et al., 2003). Otra proteína que puede aparecer asociada a este complejo es la proteína Sex comb on midleg (Scm). El complejo PRC1 tiene actividad E3-ubiquitin ligasa de la histona H2A. Esta actividad enzimática está mediada por el dominio RING de la proteína SCE/dRING (Wang et al., 2004). Otra característica funcional del complejo PRC1 es la presencia de un cromodominio en la proteína PC que permite la unión selectiva a la marca represora depositada en la lisina 27 de la histona H3 (H3K27me3) (Fischle et al., 2003).

El complejo PRC2 está compuesto por 4 proteínas: ESC (Extra Sex Comb), E(Z) (Enhancer of Zeste), Su(Z)12 (Suppressor of Zeste 12) y Nurf55 (Nucleosome remodeling factor 55). La función de PRC2 es anclar al complejo PRC1 a los diferentes loci genéticos (Figura 8). Si bien, recientemente, se ha descubierto, en vertebrados, que el complejo

PRC1 puede reclutarse al ADN independientemente del complejo PRC2 (Morey et al., 2012). El complejo PRC2 tiene actividad metil-transferasa de histonas (HMT), siendo E(Z) la subunidad catalítica, que puede metilar la lisina 9 y/o 27 de la histona H3 de los nucleosomas incrementando la afinidad de proteínas, como PC, por aquellos sitios con histonas metiladas (Czermin et al., 2002).

El complejo dRAF, recientemente caracterizado, está formado por las proteínas SCE/dRING, Posterior sex comb (PSC) y dKDM2 (Lagarou et al., 2008). Las dos primeras presentes también en el complejo PRC1. Este complejo combina 2 actividades bioquímicas simultáneamente gracias a que la enzima dKDM2 cataliza la demetilación de la histona H3 en la lisina 36 (H3K36me2) y, a su vez, estimula la ubiquitinación de la histona H2A mediado por la proteína SCE/dRING. Se considera por ello que este complejo tiene actividad super-represora de la expresión génica, lo que sugiere que, al menos en *Drosophila*, es el principal responsable de la ubiquitinación de la histona H2A, pues lo hace más eficientemente que el complejo PRC1 (Lagarou et al., 2008).

### 1.4.2. Complejos trxB y sus actividades bioquímicas

El Complejo de Acetilación Trx (TAC1) contiene las proteínas TRX (Trithorax), dCBP (Drosophila sarcoplasmic Calcium-Binding Protein), ASH1, ASH2 y dUTX. Debido a la actividad acetil-transferasa de la proteína dCBP, se piensa que dicho complejo puede estimular la transcripción mediante la modificación de los nucleosomas de los genes diana consiguiendo, de esta forma, una mayor accesibilidad de los factores necesarios para la activación (Petruk et al., 2001). Tanto la proteína TRX como ASH1 contienen un dominio SET metil-transferasa, siendo su sustrato la lisina 4 de la histona H3 (H3K4) (Bhaumik et al., 2007). La metilación H3K4 está asociada con cromatina activa (**Figura 8**) (Smith and Peterson, 2005; Beisel et al., 2007). Parece que ASH1 selectivamente previene la trimetilación de las histonas del promotor y de la región codificante asociada al silenciamiento (Papp and Muller, 2006). Y, además, ASH1 también parece encargarse de la di-metilación de la histona H3 en la lisina K36 (H3K36me2) (Tanaka et al., 2007).

El complejo COMPASS es un macro-complejo responsable de la mono-, di- y trimetilación de la histona H3 en la lisina K4 (H3K4me1, 2 o 3). En *Drosophila* existen 4 complejos COMPASS: 1) Trithorax (Trx)/COMPASS, 2) Trithorax-related (Trr)/COMPASS, 3) dSet1/COMPASS y 4) Ash1/COMPASS (Mohan et al., 2011) (**Tabla 2**). La proteína TRX fue previamente descrita como perteneciente al complejo TAC1, sin embargo este complejo no tiene homólogo en mamíferos.

### 1.4.3. Grupo de proteínas ETP (“Enhancer of tritherax and Polycomb”)

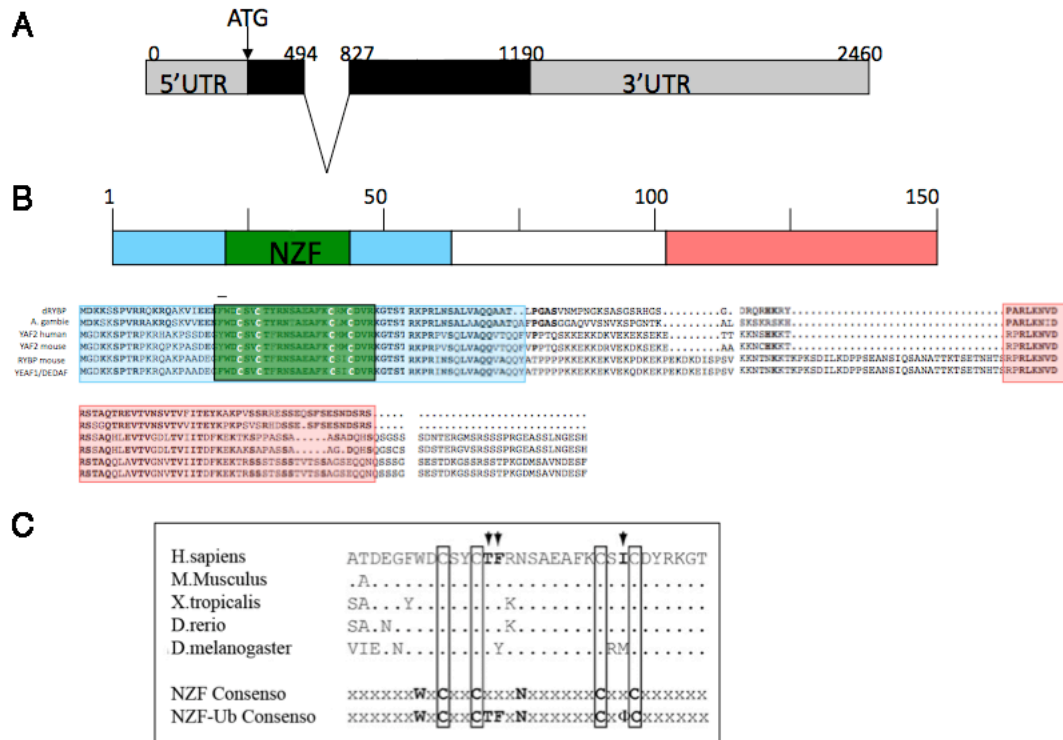
Además de las proteínas PcG y las proteínas trxG (Tabla 1 y 2), se ha caracterizado otro grupo de proteínas denominadas ETPs (Enhancer of tritherax and Polycomb) (Busturia et al., 2001; Faucheux et al., 2003; Bejarano and Busturia, 2004). Mutaciones en este tipo de genes aumentan el fenotipo de mutaciones en genes PcG y/o trxG, sugiriendo que estos genes son requeridos para la represión y activación por parte de las proteínas PcG y/o trxG, respectivamente. Además, estudios moleculares y genéticos han demostrado que estas proteínas pueden actuar como represores o activadores, es decir, que pueden interactuar con PcG y/o trxG dependiendo del contexto celular y del momento del desarrollo (Busturia et al., 2001; Bejarano and Busturia, 2004).

Una de las proteínas ETP, objeto de estudio de esta Tesis, es la proteína dRYBP (*Drosophila* Ring and Y1 Binding Protein) (Bejarano et al., 2005; Gonzalez et al., 2008) conservada filogenéticamente y que fue inicialmente descubierta en ratón debido a su interacción con el “Ring domain” de las proteínas RING1A y RING1B (homólogas a la proteína SCE/dRING de *Drosophila*), del grupo Polycomb (Garcia et al., 1999). La proteína dRYBP posee, en su N-terminal, un dominio NZF (Nucleoporin Zinc Finger) conservado de ubiquitinación y, que se ha demostrado, es la región donde la proteína murina RYBP se monoubiquitina y donde interacciona con proteínas ubiquitinadas (Arrighi et al., 2006) (Figura 9).

Además, ahora también se sabe que altos niveles de la proteína dRYBP inducen apoptosis en los discos imaginales de la mosca y que esta apoptosis es dependiente de los factores DREDD y FADD y es modulada por los niveles de la proteína TRX (Gonzalez and Busturia, 2009). El papel de las proteínas PcG y trxG en los procesos apoptóticos está poco estudiado, pero son fundamentales en la prevención de la proliferación aberrante e incontrolada que tiene lugar en los procesos cancerígenos.

En vertebrados, se ha observado que los niveles de expresión de la proteína RYBP y de algunas de las proteínas PcG/trxG están significativamente aumentados en varios tipos de cáncer, como por ejemplo en los linfomas de Hodgkin (Dukers et al., 2004; Raaphorst et al., 2004; Sanchez-Beato et al., 2004; Sanchez-Beato et al., 2006). En humanos se han encontrado, por ejemplo, altos niveles de la proteína HPH1 (el homólogo en humanos de la proteína PH de *Drosophila*) (Isono et al., 2005) en determinados tipos de cáncer. Sin embargo, se sabe poco acerca de cómo la modulación en los niveles de expresión o en la actividad de las proteínas PcG/trxG puede influenciar en la homeostasis celular resultando en un cambio beneficioso o perjudicial para la supervivencia de los organismos (Lund and van Lohuizen, 2004). El estudio de las vías de señalización que se vean afectadas por la

alteración en los niveles de distintas proteínas PcG/trxG podría ayudarnos a comprender mejor la función de estas proteínas en los mecanismos de proliferación celular o en la inducción de apoptosis.



**Figura 9.- El gen y la proteína dRYBP.** **A)** Estructura del gen *dRYBP*. Se indican los exones (en negro) y las regiones 5'UTR y 3'UTR (en gris) y su único intrón (línea). **B)** Esquema de la proteína *dRYBP* (se indica en verde el dominio NZF) y su conservación en distintas especies. (A y B modificado de (Gonzalez et al., 2008) ) **C)** Conservación del dominio NZF de la proteína *RYBP* en distintas especies. En los recuadros están las cisteínas del dominio Zinc Finger. Las flechas indican los aminoácidos críticos para el reconocimiento de la ubiquitina. (C modificado de (Arrigoni et al., 2006)).



## OBJETIVOS

---





En este trabajo de Tesis, se tuvo como objetivo estudiar los mecanismos que controlan la homeostasis celular, usando la mosca *Drosophila melanogaster* como sistema modelo. En particular, los mecanismos que regulan el balance entre los procesos de proliferación y apoptosis, ya que son importantes para conocer el desarrollo normal y patológico de los organismos.

**Los Objetivos concretos de esta Tesis fueron:**

- 1).- Estudio de la función de las proteínas de los grupos Polycomb (PcG) y trithorax (trxG) en el control de la proliferación celular y apoptosis.
- 2).- Estudio de la función de la proteína Dp53 en el control de la apoptosis y de la proliferación celular en el ala de *Drosophila*.
- 3).- Análisis de las proteínas que interaccionan con la proteína dRYBP mediante técnicas de espectrometría de masas.
- 4).- Estudio de la función del gen *dRYBP* en el mantenimiento de la expresión génica.



# MATERIALES Y MÉTODOS

---



### 3.1.- ESTIRPES DE *Drosophila* UTILIZADAS Y OBTENCIÓN DE MOSCAS TRANSGÉNICAS

Las líneas de moscas conteniendo alelos mutantes utilizadas en este trabajo fueron: *dRYBP*<sup>1</sup>, *dRYBP*<sup>Δ16</sup> y *dRYBP*<sup>Δ55</sup> (Gonzalez et al., 2008), *Sce*<sup>1</sup> (Breen and Duncan, 1986), *Pc*<sup>3</sup> (Breen and Duncan, 1986), *trx*<sup>E2</sup> (Kennison and Tamkun, 1988), *trx*<sup>1</sup> (Breen et al., 1995), *Psc*<sup>h27</sup> (Wu and Howe, 1995), *Bre1*<sup>01640</sup> (Bray et al., 2005), *Bre1*<sup>kim</sup> (van der Knaap et al., 2010), *dkdm2*<sup>KG04325</sup>, *dkdm2*<sup>EY01336</sup>, *dkdm2*<sup>DG12810</sup>, *p53*<sup>5A-1-4</sup>, *p53*<sup>11-1B-1</sup> (descritas en <http://flybase.bio.indiana.edu>), *Dp53*<sup>ns</sup> (Sogame et al., 2003), *N*<sup>55e11</sup> (Kidd et al., 1983) y *wg*<sup>1,cn</sup><sup>1</sup> (Couso and Martinez Arias, 1994). Las moscas conteniendo deficiencias genómicas utilizadas fueron: *y*<sup>1</sup>, *Df(1)w<sup>67c23</sup>* (que deleciona los genes *yellow* y *white*) y *Df(3L)H99* (que deleciona los genes pro-apoptóticos *rpr*, *hid* y *grim*) (White et al., 1994). Las moscas conteniendo duplicaciones genómicas fueron: *Dp(1;3)DC109* (duplicación del gen *Notch*) (Venken et al., 2010) y *Dp(3;3)M95A+13* (duplicación del gen *Dp53*) (descrita en <http://flybase.bio.indiana.edu>).

Las líneas de moscas transgénicas GAL4 y las líneas UAS utilizadas en los experimentos de sobre-expresión e inactivación fueron: *engrailed*-GAL4 (*en*-GAL4) (Brand et al., 1994), 248-GAL4 (cedida por la Dra. N. Azpiazu), 638-GAL4 (Calleja M. and Morata G., unpublished), *scalloped*-GAL4 (*sd*-GAL4) (Calleja et al., 1996), *sensless*-GAL4 (*sens*-GAL4) (cedida por el Dr. H Bellen), *nubbin*-GAL4, *UAS GFP* (*nub*-GAL4), *hedgehog*-GAL4 (*hh*-GAL4), *patched*-GAL4 (*ptc*-GAL4), *eyeless*-GAL4 (*ey*-GAL4), C96-GAL4, 719-GAL4 y *vestigial*[BE]-GAL4 (*vg*-GAL4) (descritas en <http://flybase.bio.indiana.edu>); *UAS-ph-EGFP*<sub>m20</sub> y *UAS-ph*<sub>C-7</sub> (Netter et al., 2001), *UAS-dome*<sup>ΔCYT</sup> (Brown et al., 2001), *UAS-dRYBP* (Gonzalez and Busturia, 2009), *UAS-p35* (Hay et al., 1994), *UAS-dkdm2*<sup>EP3093</sup> (Spradling et al., 1999), *UAS-Bre1*, *UAS-GFP* (Bray et al., 2005), *UAS-Pc*, *UAS-Sce*, *UAS-Dsp1*, *UAS-trx*, *UAS-Dp53*, *UAS-DIAP1*, *UAS-rpr*, *UAS-puc*<sup>14c</sup> y *UAS-Notch*<sup>-intra</sup> (descritas en <http://flybase.bio.indiana.edu>); *UAS-dRYBP*<sub>RNAi</sub> (Gonzalez et al., 2008), *UAS-Ubx*<sub>RNAi</sub> (cedida por el Dr. E. Sanchez-Herrero), *UAS-Sce*<sub>RNAi</sub>, *UAS-Pcl*<sub>RNAi</sub>, *UAS-Psc*<sub>RNAi</sub>, *UAS-Su(z)2*<sub>RNAi</sub>, *UAS-trx*<sub>RNAi</sub> y *UAS-ph*<sub>RNAi</sub> (Vienna *Drosophila* RNAi Center, VDRC <http://stockcenter.vdrc.at/control/main> (Dietzl et al., 2007)), *UAS-Pc*<sub>RNAi</sub>, *UAS-Dp53*<sub>RNAi</sub>, *UAS-wg*<sub>RNAi</sub>, *UAS-Notch*<sub>RNAi</sub>, *UAS-dkdm2*<sub>RNAi</sub> y *UAS-Bre1*<sub>RNAi</sub> (Transgenic RNAi Project, <http://www.flyrnai.org/TRiP-HOME.html>). También se utilizó el sistema GAL4/GAL80<sup>ts</sup> (McGuire et al., 2003) para controlar el tiempo de expresión de las proteínas de interés. Los stocks utilizados fueron: *tub*-GAL80<sup>ts</sup>/CyO; *hh*-GAL4/TM6B y *ptc*-GAL4/CyO; *tub*-GAL80<sup>ts</sup>/TM6B.

Las líneas de moscas transgénicas conteniendo las construcciones *dpp-lacZ*<sup>BS3.0</sup> (Blackman et al., 1991), *puc-lacZ*<sup>E69</sup> (Martin-Blanco et al., 1998), *rpr-lacZ* (*reaper-4kb-lacZ*) (Jiang et al., 2000), *wg-lacZ* (descrita en <http://flybase.bio.indiana.edu>), *ap-lacZ* (Cohen et al., 1992) y *m8-lacZ* (Kramatschek and Campos-Ortega, 1994) se utilizaron como reporteros de la expresión de los genes *decapentaplegic*, *puckered*, *reaper*, *wingless*, *apterous* y *enhancer of split m-8*, respectivamente. La construcción *PBX MCP Ubxpp-lacZ* (Busturia et al., 2001) fue utilizada como reportera del silenciamiento génico mediado por el elemento MCP, un elemento de respuesta a Polycomb (PRE), del gen *Abd-B*. Las líneas de moscas *sensor-bantam-GFP* (Brennecke et al., 2003) y *pGR-NRE* (Housden et al., 2012) se utilizaron como reporteros de la expresión del micro-ARN bantam y de un elemento cis-regulador del gen *Notch* fusionado a la proteína GFP, respectivamente.

Para la obtención de moscas transgénicas se siguieron protocolos establecidos (Rubin and Spradling, 1982), utilizándose como huéspedes para el ADN foráneo embriones de la cepa *y<sup>1</sup>, Df(1)w<sup>67c23</sup>* (<http://flybase.org/>). La concentración de ADN que se inyectó fue de 0,4mg/ml junto con un plásmido de ADN que codifica para la transposasa a una concentración de 0,1mg/ml. Las moscas resultantes (generación G0), se cruzaron con *y<sup>1</sup>, Df(1)w<sup>67c23</sup>* para la identificación de los individuos transformantes. Para la localización y el balanceo de los transformantes se utilizó el stock *Df(1)w<sup>67c23</sup>; If/CyO; MKRS/ TM6B*. Las moscas fueron inyectadas, en la mayoría de los casos, por el servicio de transgénesis de la plataforma Consolider *Drosophila*.

Para la generación de los clones de ganancia de función de PH durante el desarrollo larvario se utilizó el stock *y<sup>1</sup>w<sup>1118</sup>, hsp70-FLP122; actina FRT [y+] FRT GAL4, UAS-GFP/SM5* (Ito et al., 1997). Para la inducción de los clones se utilizó el sistema FLP/FRT (Golic and Lindquist, 1989; Xu and Rubin, 1993). Se cruzaron hembras vírgenes del stock *y<sup>1</sup>w<sup>1118</sup>, hsp70-FLP122; actina FRT [y+] FRT GAL4, UAS-GFP/SM5* (Ito et al., 1997) con machos de los stocks (1) *If/CyO; UAS:phc7* y (2) *dpplacz/CyO; UAS-phc7* y la descendencia se sometió a un choque térmico a 34°C durante 10 minutos a las 48-72h de desarrollo.

### 3.2.- SISTEMA GAL4/UAS

Para los experimentos de sobre-expresión e inactivación de genes se utilizó el sistema GAL4/UAS (Brand et al., 1994). Con este sistema se puede controlar espaciotemporalmente la expresión de un gen determinado mediante el uso de una gran variedad de líneas de moscas transgénicas que contienen la proteína GAL4, cuya expresión es dependiente de temperatura (ver líneas utilizadas, apartado 3.1.). La sobre-expresión/inactivación fue realizada poniendo los cruces correspondientes, en medios de

cultivo estándares, a 17°C, 25°C ó 29°C, según el requerimiento experimental, para permitir la viabilidad de la descendencia. Los cruces experimentales realizados con las líneas *tub-GAL80<sup>ts</sup>/CyO*; *hh-GAL4/TM6B* y *ptc-GAL4/CyO*; *tub-GAL80<sup>ts</sup> /TM6B* se mantuvieron a 17°C (temperatura a la cual el GAL80<sup>ts</sup> está inhibiendo la activación del GAL4) hasta que la descendencia alcanzó el 2º estadio temprano, momento en el que se pasaron a 29°C (a esta temperatura el GAL80<sup>ts</sup> se inactiva por lo que se activa el GAL4 y con ello la expresión del gen de interés).

### 3.3.- INTERACCIONES GENÉTICAS

En el estudio de las interacciones genéticas se puso especial cuidado en evitar condiciones de hacinamiento, por lo que las moscas parentales se transfirieron a otros tubos cada 2 o 3 días, ya que los fenotipos relacionados con las mutaciones en los genes del grupo PcG y, en general, en los genes estudiados, eran especialmente sensibles a dichas condiciones. Se analizaron aproximadamente 100 moscas progenie de cada cruce establecido para el estudio de la combinación mutante.

### 3.4.- MEDIOS DE CULTIVO

El mantenimiento de los cruces experimentales y stocks de moscas se realizó en tubos de papilla estándar. En aquellos experimentos en los que se precisó, los cruces fueron mantenidos en medios de cultivo conteniendo azul de bromofenol al 5% (papilla azul) con el fin de poder distinguir las larvas en el mismo estadio del desarrollo, ya que al alimentarse con esta papilla el aparato digestivo de las larvas se tiñe de azul, y en el momento en el que se vaya a producir la pupación (al final del tercer estadio larvario) éstas lo expulsan.

Para el mantenimiento de los discos imaginales diseccionados antes de su procesamiento para los experimentos de q-RT-PCR se utilizó medio de cultivo Schneider M3.

### 3.5.- TINCIONES HISTOQUÍMICAS CON X-GAL

La disección de los discos imaginales de larvas se realizó en PBS (Phosphate Balanced Saline) y se transfirieron a una solución de PBS con glutaraldehído al 0,5% durante 10 min. en hielo. Transcurrido este tiempo, se lavaron 3 veces con PBS durante 10 min. Por último se incubaron las muestras en 1ml de solución (10mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 150mM NaCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 3,5mM K<sub>3</sub>FeCN<sub>6</sub>, 3,5mM K<sub>4</sub>FeCN<sub>6</sub>, pH a 7,2) conteniendo 30ml de X-gal (Promega). Las muestras se incubaron a 37°C hasta que se desarrolló una coloración azul.



### 3.6.- TINCIONES INMUNO-HISTOQUÍMICAS

#### 3.6.1.- Tinción de discos imaginales con anticuerpos

Los discos imaginales de larvas se diseccionaron en PBS y se fijaron durante 30 minutos en una solución de fijación conteniendo 4% de paraformaldehído, 0,1% Tritón-X-100 y 0,1% de DOC en PBS. Después de 3 lavados de 15 minutos con PBT (PBS 0,1%, Tritón-X-100), se bloquearon durante 30 minutos en solución de bloqueo (BSA al 1% en PBT). Todos estos pasos se hicieron a temperatura ambiente (25°C). A continuación, los discos se incubaron a 4°C durante toda la noche con los anticuerpos primarios específicos en solución de bloqueo. Pasado este tiempo se lavaron tres veces durante 15 minutos con la solución de bloqueo y se incubaron con los anticuerpos secundarios apropiados durante dos horas a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios están acoplados a biotina o a un fluoróforo específico dependiendo del modo en que se quiera analizar la muestra al microscopio, bien en campo claro o bien en fluorescencia, respectivamente. Con el primer sistema de detección de anticuerpos se obtiene una señal mayor debido a que hay un paso más de amplificación que consiste en la posterior incubación con el complejo ABC (Avidina y Biotina unida a peroxidasa) (Vector laboratories) y revelado final con DAB (Diaminobencidina) en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3%. El montaje de las muestras se realizó en glicerol, para el análisis en campo claro, o en Vectashield (Atom), para el análisis en fluorescencia. La relación de anticuerpos primarios y secundarios utilizados aparecen en la

**Tabla 3:**

| Anticuerpos primarios   |                    |         |                                 |
|-------------------------|--------------------|---------|---------------------------------|
| Anticuerpos             | Dilución utilizada | Especie | Referencia                      |
| Anti-Caspasa-3 activada | 1:50               | Conejo  | Cell Signalling Technologies    |
| Anti-β-Gal              | 1:100              | Ratón   | Promega                         |
| Anti-GFP                | 1:300              | Conejo  | Invitrogen                      |
| Anti-PH                 | 1:200              | Conejo  | DeCamillis <i>et al.</i> , 1992 |
| Anti-PH3                | 1:200              | Conejo  | Upstate Technologies            |
| Anti-Wg                 | 1:25               | Ratón   | Iowa Hybridoma Bank             |
| Anti-En                 | 1:200              | Ratón   | Iowa Hybridoma Bank             |
| Anti-Ubx                | 1:20               | Ratón   | Iowa Hybridoma Bank             |
| Anti-Abd-B              | 1:20               | Ratón   | Celniker <i>et al.</i> , 1989   |
| Anti-Cubitus            | 1:50               | Rata    | Iowa Hybridoma Bank             |
| Anti-dMyc               | 1:100              | Cerdo   | Herranz <i>et al.</i> , 2008    |
| Anti-Dp53               | 1:20               | Ratón   | Iowa Hybridoma Bank             |

|  |                 |                |  |
|--|-----------------|----------------|--|
| Anti-Cut                                     | 1:20            | Ratón          | Iowa Hybridoma Bank                      |
| Anti-Sens                                    | 1:100           | Cobaya         | Nolo <i>et al.</i> , 2000                |
| Anti-Eyg                                     | 1:100           | Cobaya         | Aldaz <i>et al.</i> , 2003               |
| Anti-Notch-intra                             | 1:20            | Ratón          | Iowa Hybridoma Bank                      |
| <b>Anticuerpos secundarios biotinilados</b>  |                 |                |  |
| <b>Anticuerpos</b>                           | <b>Dilución</b> | <b>Especie</b> | <b>Referencia</b>                        |
| Anti-ratón                                   | 1:200           | Conejo         | Jackson ImmunoResearch Laboratorios, Inc |
| Anti-conejo                                  | 1:200           | Ratón          | Jackson ImmunoResearch Laboratorios, Inc |
| <b>Anticuerpos secundarios fluorescentes</b> |                 |                |  |
| <b>Anticuerpos</b>                           | <b>Dilución</b> | <b>Especie</b> | <b>Referencia</b>                        |
| Alexa 488 (anti-ratón)                       | 1:500           | Burro          | Invitrogen                               |
| Alexa 488 (anti-conejo)                      | 1:500           | Burro          | Invitrogen                               |
| Alexa 488 (anti-rata)                        | 1:500           | Burro          | Invitrogen                               |
| Alexa 555 (anti-ratón)                       | 1:500           | Burro          | Invitrogen                               |
| Alexa 555 (anti-conejo)                      | 1:500           | Burro          | Invitrogen                               |
| Alexa 555 (anti-rata)                        | 1:500           | Cabra          | Invitrogen                               |
| Alexa 555 (anti-cobaya)                      | 1:500           | Cabra          | Invitrogen                               |
| Alexa 647 (anti-ratón)                       | 1:500           | Burro          | Invitrogen                               |
| Alexa 647 (anti-conejo)                      | 1:500           | Burro          | Invitrogen                               |

**Tabla 3.- Relación de anticuerpos utilizados para inmunohistoquímica.**

En el caso de las tinciones de embriones, éstos se recogieron y se decorionaron en lejía durante 2 minutos, se lavaron con agua, se eliminó el exceso de líquido y se recogieron en heptano. A continuación, se fijaron durante 20 minutos en agitación en una mezcla de 500ml heptano/500ml formaldehído 4%. Se retiró el fijador (fase acuosa) y se desvitelinizaron añadiendo metanol 100% y agitando durante 20 segundos. Después se lavaron 3 veces durante 5 minutos con PBT para re-hidratarlos. El resto del protocolo sigue tal y como se ha descrito anteriormente.

### 3.6.2.- Tinciones con Faloidina y To-Pro-3

Después de la disección y fijación de las muestras como se ha descrito anteriormente, se incubaron durante 10 minutos con el compuesto correspondiente a una dilución 1:500 en PBT-BSA 1%. La Faloidina (Sigma) se usó como marcador celular de membrana y el To-Pro-3 (Invitrogen) como marcador nuclear.

### 3.7.- HIBRIDACIONES “IN SITU” DE DISCOS IMAGINALES

Se diseccionaron los discos imaginales de las larvas correspondientes en PBS y se fijaron durante 20 minutos en 4% de paraformaldehído y PBT. La sonda de ARN de *dpp* (cedida por María Martín) o *upd* (cedida por el Dr. J. Castelli-Gair Hombria) se dejó hibridando toda la noche a 55°C con los discos fijados en solución de hibridación (formamida deionizada 50%, SSC 5x, esperma de salmón 10 mg/μl, heparina 50μg/ml, 0.1% Tween-20 y H<sub>2</sub>O DEPC). Después de 3 lavados de 15 minutos cada uno en PBT, los discos imaginales ya hibridados se incubaron con el anticuerpo anti-digoxigenina-AP (anti-DIG-AP) (Roche) 1:2000 en PBT (los fragmentos Fab del anticuerpo están acoplados a la enzima alcalina fosfatasa (AP: Alcaline Phosphatase) durante 1 hora y 30 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se lavaron 3 veces durante 20 minutos en PBT y a continuación se incubaron en la solución de revelado (NaCl 4M, MgCl<sub>2</sub> 1M, Tris pH 9.5 1M, 10% Tween-20 en H<sub>2</sub>O destilada) junto con los reactivos NBT (4-NitroBlueTetrazolium chloride) y tampón-X-fosfato, que actúan como sustratos para la enzima fosfatasa alcalina (AP). La reacción se para con PBT y los discos resultantes se montan en glicerol para ser examinados y fotografiados.

Para las tinciones dobles, in situ más tinción con anticuerpos fluorescentes, se diseccionaron, se fijaron y se hibridaron los discos como se ha descrito anteriormente. A continuación, se lavaron en PBT y se incubaron con el anticuerpo anti-DIG-AP 1:2000 junto con el anticuerpo primario correspondiente en PBT durante 1h y 30 min. a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se lavaron 3 veces durante 20 min. en PBT y se incubaron nuevamente con el anticuerpo anti-DIG-AP 1:2000 junto con el anticuerpo secundario fluorescente correspondiente durante 2 horas a temperatura ambiente. Seguidamente, se lavaron en PBT y se incubaron en la solución de revelado como se ha descrito anteriormente. Los discos se montan en Vectashield (Atom) para su posterior análisis en fluorescencia.

### 3.8.- RT-PCR CUANTITATIVA

La extracción de ARN total se realizó a partir de discos imaginales de larvas de tercer estadio. Se diseccionaron 100 discos de ala de larvas *sd-GAL4/+; UAS-ph-EGFP<sup>m20</sup>/+* y 100 discos de larvas *sd-GAL4/+; UAS-GFP/+*, que fueron utilizadas como control del experimento. Los discos se diseccionaron en PBS e inmediatamente después se transfirieron a un tubo eppendorf conteniendo medio de cultivo M3, en hielo, para su conservación hasta proceder a la extracción del ARN. El ARN se extrajo siguiendo el protocolo estándar: se homogeneizaron las muestras en 500μl de TRIZOL y se dejaron

incubando durante 5 minutos a temperatura ambiente, a continuación se añadieron 100µl de cloroformo y se mezcló durante 15 segundos, se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó durante 15 minutos a 12000 x g a 4°C. Se traspasó la fase superior (fase acuosa) a un tubo nuevo con cuidado de no tocar la interfase, se añadieron 250µl de isopropanol y se mezcló invirtiendo el tubo varias veces (en este paso se precipita el ARN). Seguidamente se centrifugó durante 15 minutos a 12000 x g a 4°C, tras lo cual se decantó el sobrenadante y se lavó el precipitado del fondo del tubo (ARN) con 400µl de 70% etanol. Se centrifugó durante 10 minutos, se decantó con cuidado el sobrenadante y se secó el precipitado al aire. Finalmente, se resuspendió el precipitado en 25µl de H<sub>2</sub>O-DEPC.

A partir de un microgramo de ARN se llevó a cabo la reacción de transcripción inversa o retro-transcripción durante 2 horas a 37°C según las instrucciones del kit de (Applied Biosystems). Previamente, se cuantificó la cantidad de ARN utilizando el equipo Nanodrop ND-1000 y se analizaron las muestras en el Bioanalizador Agilent 2100 (ambos equipos disponibles en el servicio de genómica del CBMSO) para verificar la calidad del ARN. Las reacciones de la PCR cuantitativa a tiempo real se llevaron a cabo usando el LightCycler FastStart DNA MasterSYBR Green I kit (ROCHE) bajo condiciones estándar. Las secuencias de los oligonucleótidos (Sigma) que se utilizaron para la detección de los niveles de expresión de los genes correspondientes, se muestran en la **Tabla 4**:

| Nombre Oligo | Secuencias  |
|--------------|---|
| php          | 5'-ATCTGCTCAGGTCCACCAAC-3' y 5'-CAGTGGAAAGGTGACCCACT-3'         |
| Upd2         | 5'-AGCGCCAGCCAAGGACGAGTTATC-3' y 5'-TTGGCTGGCGTGTGAAAGTTGAGA-3' |
| dpp          | 5'-GCCAACACAGTGCGAAGTTTAA-3' y 5'-TGGTGCGGAAATCGATCGT-3'        |
| Ciclina B    | 5'-ACATCTACGATGCCACCAC-3' y 5'-GCTCCAGCTCCACCTGATAC-3'          |
| dMyc         | 5'-CAGTTCCAGTTCGACAGTCAA-3' y 5'-AGATAAACGCTGCTGGAGGA-3'        |
| rpr          | 5'-AGGCGACTCTGTTGCGGGAG-3' y 5'-TGCATGGCTTGCGATATTTG-3'         |
| tubulina     | 5'-TCCAATCGCAACAAAAATTCA-3' y 5'-TCGTTTTCTGATGCTTTTCAGTGT-3'    |

**Tabla 4.** Secuencias de oligonucleótidos utilizados en la PCR cuantitativa.

La cuantificación de los niveles de ARNm fueron relativizados en comparación con los obtenidos para el gen *tubulina*, utilizado como control endógeno del experimento. La cuantificación relativa de los resultados obtenidos fue calculada usando el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak and Schmittgen, 2001).

### 3.9.- PURIFICACIÓN DEL ANTICUERPO ANTI-dRYBP A PARTIR DE LA PROTEÍNA HIS-dRYBP.

Se transformaron bacterias competentes *E.coli* M15 (Quiagen) con el vector 6xHis pQE-30-dRYBP (Bejarano et al., 2005). La inducción, extracción y purificación de la proteína recombinante se realizó siguiendo el protocolo “The QIAexpressionist” (Quiagen). Una vez purificada, la proteína recombinante 6xHis-dRYBP se acopló a una matriz Affi-gel 10 (Bio-

Rad) para la purificación del anticuerpo anti-dRYBP, a partir del suero, mediante cromatografía por afinidad, siguiendo el protocolo establecido en (Chalkley and Verrijzer, 2004). El anticuerpo anti-dRYBP purificado se evaluó por Western-Blotting.

### **3.10.- OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS NUCLEARES A PARTIR DE EMBRIONES DE *Drosophila*.**

Se partió de 100 gramos de embriones de 0-12h procedentes de moscas de la cepa *Canton S*. Los embriones se recolectaron de las placas de puesta y se decorionaron durante 90 segundos en un filtro grande con una solución de hipoclorito de sodio al 2.5%, se lavaron con H<sub>2</sub>O destilada conteniendo 10% Tritón X-100 y NaCl 5M. A continuación, se transfirieron a un homogeneizador Yamato LH-21 y resuspendieron en una solución conteniendo Hepes-KOH pH7.6 15mM, KCl 10mM, MgCl<sub>2</sub> 5mM, EDTA 0.1mM, EGTA 0.5mM, sacarosa 350mM, DTT 1mM, metabisulfito de sodio 1mM y PMSF 0.2mM (solución 1) (3 ml/g de embrión decorionado). Seguidamente, se homogeneizaron a 1000r.p.m. a 4°C. El homogeneizado se filtró a través de un filtro Miracloth y se pasó a 2 tubos de centrifuga GSA. A continuación, se centrifugó durante 15 min. a 8000r.p.m. a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en la solución 1 (5ml/g de embrión decorionado). Se volvió a homogeneizar la muestra en un homogeneizador de vidrio tipo dounce dando 3 pases con el émbolo de tipo B. Seguidamente, se centrifugó el homogeneizado durante 20 min. a 8000r.p.m. a 4°C. A partir de este paso, se procedió siguiendo el clásico protocolo de Kadonaga (Kamakaka et al., 1991) hasta la obtención final de los extractos de proteínas. La cuantificación de proteínas totales en los extractos proteicos se llevó a cabo según el método descrito por Lowry et al., 1951. La concentración de proteínas ha de ser entre 12-18 mg/ml. De los extractos proteicos obtenidos (10-20 ml aprox.) se hicieron alicuotas de 1ml, se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron a -80°C hasta su uso.

### **3.11.- ENSAYOS DE INMUNOPRECIPITACIÓN**

En primer lugar, se procedió al acoplamiento del anticuerpo policlonal anti-dRYBP, previamente purificado (ver apartado 3.9), con las bolitas de proteína A sepharosa de *Staphylococcus aureus* (GE Healthcare). Para ello, se incubó 1ml de anticuerpo anti-dRYBP con 200µl de bolitas de proteína A durante 30 min. a temperatura ambiente en agitación. Pasado este tiempo se centrifugó a 1000r.p.m. durante 3 min., se retiró el sobrenadante y se añadió 0.005g de dimetilpimelidato (Sigma-Aldrich) en 1 ml de borato sódico 0.2M, pH 9.0 para que el acoplamiento (*cross-link*) entre las bolitas y el anticuerpo fuese más fuerte, incubándolo durante 30 min. a temperatura ambiente en agitación. A continuación, se centrifugó a 1000r.p.m. durante 3 min., se retiró el sobrenadante y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con 1ml de etanolamina 0.2M pH 8.0 para parar el *cross-*

*link*. Finalmente, tras recuperar las bolitas mediante centrifugación a 1000r.p.m. durante 3 min., se lavaron 2 veces con PBS y se guardaron a 4°C hasta su uso.

Para la inmunoprecipitación de las proteínas de los extractos nucleares de embriones (NEs) (apartado 3.10) con el anticuerpo anti-dRYBP acoplado a las bolitas de proteína A, se descongelaron 2 ml de extractos proteicos en hielo, 1ml para el *mock* (que contiene sólo las bolitas de proteína A, sin anticuerpo, y que será usado como control negativo del experimento) y 1ml para su incubación con el anticuerpo anti-dRYBP acoplado a las bolitas. La incubación se llevó a cabo durante 2h a 4°C en agitación. Pasado este tiempo se centrifugó a 1000 r.p.m. durante 3 min. y se retiró el sobrenadante (*unbound fraction*), que se guarda para posterior análisis por SDS-PAGE. A continuación, las bolitas fueron lavadas 2 veces con la solución de lavado HEMG (50mM HEPES, 0.2mM EDTA, 25mM MgCl<sub>2</sub> y 20% de glicerol) conteniendo bien 400mM KCl ó bien 800mM KCl, dependiendo de las condiciones experimentales que requerían menor o mayor grado de restricción, respectivamente. Tras cada lavado, las bolitas eran recuperadas mediante centrifugación a 1000 r.p.m. durante 3 min. y los sobrenadantes fueron descartados. Finalmente, las bolitas fueron lavadas con la solución de elución (100mM Glicina, 150mM NaCl, pH 2.5) y centrifugadas a 1000 r.p.m. durante 5 min. Los sobrenadantes conteniendo las proteínas inmunoprecipitadas se guardaron a -20°C para su posterior análisis por espectrometría de masas o por Western Blot.

### 3.12.- ANÁLISIS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 15% en presencia de SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) se separaron las proteínas contenidas en: 1) las fracciones eluidas en los ensayos de inmunoprecipitación (IP-dRYBP), 2) la fracción de proteínas nucleares totales (NE) y 3) el *mock*. A continuación el gel fue revelado con solución de Azul de Coomassie (GE-Healthcare), incubándolo con dicha solución durante 1h y 30 min. a temperatura ambiente, y lavado posteriormente con solución de desteñir fuerte (50% metanol y 10% ácido acético), y a continuación con solución de desteñir normal (10% metanol y 5% ácido acético).

Alternativamente, la detección de proteínas en el gel puede hacerse mediante tinción con solución de plata, que es un método mucho más sensible, y que consiste en hacer lavados secuenciales de 10-15 min. con 50% metanol, 5% ácido acético, DTT 1M y AgNO<sub>3</sub> (0.25g en 250ml), para posteriormente incubarlo con la solución de revelado conteniendo (7.5g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y 125µl Formaldehído 37% en 250ml) hasta la aparición de las bandas de proteínas en el gel. La reacción se para añadiendo ácido acético al 5%.

Las muestras, es decir, las proteínas separadas en gel, fueron procesadas en el Servicio de Espectrometría de masas del Departamento de Bioquímica del Erasmus Medical Center de Rotterdam (Holanda). El primer paso del procesamiento consiste en recortar las proteínas directamente del gel dónde han sido resueltas. El siguiente paso en el procedimiento es la digestión de las mismas mediante una proteasa específica (generalmente tripsina porcina), que genera un conjunto de péptidos (denominados péptidos trípticos porque han sido generados mediante el corte con tripsina) que pasan a ser analizados mediante espectrometría de masas LC-MS/MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry), obteniéndose un espectro de masas (MS) denominado “Huella Peptídica”. Adicionalmente, se obtienen espectros de fragmentación (MS/MS) de las 3-5 masas mayoritarias dentro de cada una de las huellas peptídicas. La identificación de proteínas, en este caso de todas aquellas que interaccionan con la proteína dRYBP, se realiza automáticamente mediante el sistema GPS (Global Protein Server) acoplado a los datos del LC-MS, combinando ambos tipos de espectros (MS-MS/MS) obtenidos para cada muestra y usando como motor de búsqueda MASCOT (MatrixScience, UK) sobre bases de datos públicas de secuencias de proteínas (**Figura 40B**). Así, a cada proteína identificada se le asigna un valor estadístico, denominado “*Mascot Score*”, que refleja la suma de los “scores” individuales de cada péptido, y que es más alto cuanto mayor similitud haya entre los datos experimentales y los datos teóricos. Se considera un buen “score” individual cuando el valor es mayor o igual a 60, siendo este valor el resultado de dividir el valor del “*Mascot Score*” entre el número de péptidos únicos identificados en la muestra. Otro parámetro importante a tener en cuenta es el denominado “*Sequence Coverage*”, que viene dado en porcentaje y que representa la abundancia de cada proteína en la muestra.

### 3.13.- WESTERN-BLOTTING

Las proteínas de las fracciones eluidas en los ensayos de inmunoprecipitación (IP-dRYBP) fueron separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 15% en presencia de SDS (SDS-PAGE) y transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Whatman). La membrana se bloqueó durante 30 min. a temperatura ambiente en la solución de bloqueo (PBS conteniendo 3% BSA) en agitación y, pasado este tiempo, se lavó 2 veces con PBT (PBS conteniendo 0.05% Tween-20) durante 15 min. Después se incubó a 4°C durante toda la noche, en agitación, en una solución de PBS-BSA al 1% conteniendo los anticuerpos primarios correspondientes y a la concentración indicada en la **Tabla 5**. A la mañana siguiente, la membrana se lavó 3 veces durante 15 min. con PBT, y seguidamente, se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente, a la concentración indicada en la **Tabla 5**, acoplado bien a peroxidada (HRP: Horse-Radish Peroxidase) ó bien a fosfatasa alcalina (AP), durante 1 h y 30 min., a temperatura ambiente y en agitación. Finalmente,

después de 15 min. de lavados con PBT, se visualizaron las bandas inmunoreactivas con la utilización de los sistemas de detección ECL (Enhanced Chemiluminescence) (GE Healthcare life Sciences) o NBT/BCIP (Thermo Scientific), según procediese y siguiendo las instrucciones de las casas comerciales. Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados fueron:

| Anticuerpos primarios                                    |          |         |                             |
|--|----------|---------|-----------------------------|
| Anticuerpos  | Dilución | Especie | Referencia                  |
| Anti-dRYBP   | 1:500    | Conejo  | (Bejarano et al., 2005)     |
| Anti-SCE   | 1:200    | Conejo  | (Lagarou et al., 2008)      |
| Anti-dKDM2   | 1:200    | Cobaya  | (Lagarou et al., 2008)      |
| Anti-PSC   | 1:200    | Conejo  | (Lagarou et al., 2008)      |
| Anti-PC  | 1:200    | Conejo  | (Mohd-Sarip et al., 2002)   |
| Anti-BRE1  | 1:200    | Conejo  | (Van der Knaap et al, 2010) |
| Anticuerpos secundarios unidos a peroxidasa (HRP)        |          |         |                             |
| Anticuerpos  | Dilución | Especie | Referencia                  |
| Anti-conejo  | 1:5000   | Burro   | GE Healthcare               |
| Anti-cobaya  | 1:500    | Conejo  | Sigma-Aldrich               |
| Anticuerpos secundarios unidos a fosfatasa alcalina (AP) |          |         |                             |
| Anticuerpos  | Dilución | Especie | Referencia                  |
| Anti-conejo  | 1:2000   | Cabra   | Sigma-Aldrich               |
| Anti-cobaya  | 1:2000   | Cabra   | Sigma-Aldrich               |

**Tabla 5.- Relación de anticuerpos utilizados para Western-blot.**

### 3.14.- PREPARACIÓN DE CUTÍCULAS ADULTAS Y LARVIARIAS

Para la preparación de cutículas adultas, las partes diseccionadas de las mismas (ala, pata, halterio, tórax) se calentaron en KOH al 10% durante 3 minutos a 90°C para retirar la grasa de las muestras, a continuación se lavaron en H<sub>2</sub>O y se deshidrataron en alcohol absoluto. El montaje de las muestras se llevó a cabo en Euparal (ANSCO).

Para la preparación de cutículas larvianas, los embriones se dejaron desarrollar durante 24h (hasta larva de primer estadio), se decorionaron con lejía durante 2 min. y se desvitelinizaron en una solución 1:1 Heptano:Metanol mediante agitación durante 20 s., se lavaron con Metanol y posteriormente con PBS. Las cutículas larvianas fueron montadas en Hoyer conteniendo ácido láctico e incubadas a 65°C durante toda la noche.

### 3.15.- TÉCNICAS DE MICROSCOPIA

Las moscas se observaron en microscopios binoculares. Para la observación de los discos imaginales y embriones teñidos con anticuerpos fluorescentes se utilizaron microscopios de fluorescencia (Confocal LSM510 Vertical, Confocal LSM510 Invertido,



Confocal LSM510 Meta). Para tinciones en visible y para la observación de cutículas se utilizó el microscopio vertical Axioscop2 plus acoplado a una cámara CCD color Zeiss. Las imágenes obtenidas fueron procesadas usando el programa Adobe PhotoShop CS3.

### 3.16.- ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

Para la identificación de los sitios de unión de Dp53 a los genes *Notch* y *wingless*, se analizaron las regiones genómicas de dichos genes con la ayuda de la plataforma de Bioinformática de la Universidad de Barcelona. La secuencia consenso de unión al ADN de p53 está conservada y definida originalmente como 2 copias en tándem de un decámero formado por las bases <RRRCWWGYYY>, separados entre si por 0-13pb, donde “R” representa purinas, “W” representa adenina o timidina, e “Y” representa pirimidinas (el-Deiry et al., 1992). La localización de las secuencias se realizó mediante la aplicación de 2 matrices (p53 weight matrices) que fueron:

| V\$P53_02 |    |    |     |    |   |  | V\$P53_DECAMER_Q2 |    |    |    |    |   |  |
|-----------|----|----|-----|----|---|--|-------------------|----|----|----|----|---|--|
| 01        | 40 | 13 | 23  | 23 | N |  | 1                 | 25 | 3  | 16 | 2  | N |  |
| 02        | 20 | 3  | 70  | 5  | G |  | 2                 | 14 | 0  | 32 | 0  | G |  |
| 03        | 55 | 3  | 40  | 0  | R |  | 3                 | 25 | 0  | 21 | 0  | R |  |
| 04        | 0  | 93 | 0   | 5  | C |  | 4                 | 2  | 39 | 4  | 1  | C |  |
| 05        | 53 | 8  | 8   | 30 | W |  | 5                 | 32 | 2  | 4  | 8  | W |  |
| 06        | 15 | 0  | 3   | 82 | T |  | 6                 | 23 | 2  | 2  | 19 | T |  |
| 07        | 0  | 0  | 100 | 0  | G |  | 7                 | 3  | 0  | 43 | 0  | G |  |
| 08        | 0  | 50 | 0   | 50 | Y |  | 8                 | 9  | 15 | 5  | 17 | Y |  |
| 09        | 0  | 68 | 0   | 30 | C |  | 9                 | 2  | 28 | 9  | 7  | C |  |
| 10        | 12 | 35 | 3   | 48 | Y |  | 10                | 5  | 22 | 5  | 14 | Y |  |



## RESULTADOS

---



### 4.1.- FUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE LOS GRUPOS POLYCOMB (PcG) Y TRITHORAX (trxG) EN EL CONTROL DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR Y APOPTOSIS.

Las proteínas PcG y trxG juegan un papel crucial en el desarrollo de los organismos debido a su función en el mantenimiento de los estados transcripcionales génicos, reprimidos o activados, respectivamente, a lo largo de la proliferación celular que tiene lugar durante el desarrollo (Kiefer, 2007). La función de estas proteínas ha sido estudiada, en gran parte, debido a su acción sobre el mantenimiento de la expresión de los genes homeóticos (Jurgens, 1985). Sin embargo, estudios en mamíferos y estudios emergentes en *Drosophila* ponen de manifiesto su importancia en la regulación de la expresión de genes involucrados en otros procesos biológicos como la proliferación celular, la apoptosis y tumorigénesis (Ferres-Marco et al., 2006; Martinez and Cavalli, 2006; Oktaba et al., 2008; Probst et al., 2009). En mamíferos, alteraciones en los niveles de expresión de estas proteínas están estrechamente asociadas con el desarrollo de tumores y cáncer (Mills, 2010). En este trabajo de Tesis se ha estudiado el efecto de la modulación de los niveles de expresión de las proteínas PcG/trxG sobre la proliferación celular y/o apoptosis utilizando el disco imaginal de ala de *Drosophila* como sistema modelo.












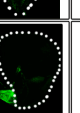















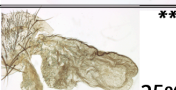










#### 4.1.1- Estudio de los fenotipos asociados a la sobre-expresión e inactivación de las proteínas PcG y trxG.

Para el estudio de los fenotipos asociados a la sobre-expresión e inactivación de las proteínas PcG y trxG se utilizó el sistema UAS/GAL4 (Brand et al., 1994). Para analizar los efectos en apoptosis y proliferación, se estudió el fenotipo de las alas y se analizó la expresión en los discos imaginales de la Caspasa-3 activada (C3) (Nicholson et al., 1995) y de la fosfo-histona-3 (PH3) (Tapia et al., 2006), como marcadores, respectivamente, de apoptosis y proliferación celular. Cuando se consideró necesario se analizó la expresión de las proteínas homeóticas UBX y ABD-B, cuya expresión está afectada por la falta de función de los genes *PcG* y *trxG* (Jurgens, 1985; Beck et al., 2010), y su des-regulación podría enmascarar los fenotipos relacionados con la apoptosis y la proliferación debidos a la falta o la ganancia de las proteínas PcG/trxG.

La **Tabla 6**, recopila todos los fenotipos observados en el ala de los individuos adultos producidos por la sobre-expresión e inactivación de las diferentes proteínas PcG/trxG estudiadas, así como el análisis de la expresión de los distintos marcadores (C3, PH3, UBX, ABD-B) en los discos imaginales de ala. Tanto el estudio de la función de la proteína dRYPB (*Drosophila* Ring and YY1 Binding Protein) en los mecanismos de apoptosis, como la función de la proteína Polyhomeotic (PH) en la proliferación se describirán más detalladamente en los apartados 4.1.2 y 4.1.3, respectivamente. A

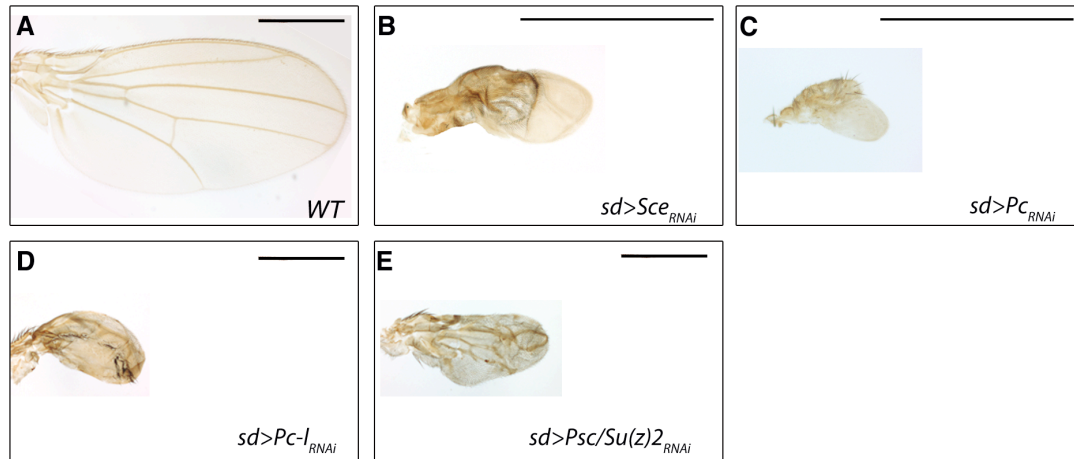
continuación, se describirán los fenotipos más destacados resultantes de la inactivación y/o sobre-expresión de las proteínas PC, SCE/dRING, PSC y Su(z)2, componentes del complejo PRC1, de la proteína PCL del complejo PRC2-PCL y de DSP1, una de las proteínas que reclutan los complejos PRC1 y PRC2 al ADN (Dejardin et al., 2005). Finalmente, también se describirán los efectos de la inactivación y de la sobre-expresión de la proteína TRX del grupo trxG.

Los fenotipos de las alas de las moscas *sd-GAL4/+; UAS-SceRNAi/+*, *sd-GAL4/+; UAS-PcRNAi/+*, *sd-GAL4/+; UAS-PclRNAi/+* y *sd-GAL4/+; UAS-PscRNAi/UAS-Su(z)2RNAi* en los que se inactivaron los genes *Sce*, *Pc*, *Pcl* y *Psc/Su(z)2*, respectivamente, son similares (**Tabla 6, Figura 10**): alas de tamaño muy reducido y parcialmente transformadas a halterio. Estas transformaciones fueron más fuertes en alas de moscas *sd-GAL4/+; UAS-SceRNAi/+* y *sd-GAL4/+; UAS-PcRNAi/+*. Se encontró que estos fenotipos eran debidos tanto a la inducción de apoptosis (detectada por la expresión de C3) (**Tabla 6, Figura 11**), como a la des-represión de UBX en los discos imaginales de ala (**Tabla 6, Figura 11**). La transformación de ala en halterio ya sugería que la expresión de la proteína UBX pudiera estar afectada, ya que en individuos silvestres, la proteína UBX sólo se expresa en el disco imaginal de halterio confiriendo a las células identidad de halterio, pero no en el ala, con la excepción de las células de la membrana peripodial (White and Wilcox, 1984). Para estudiar la contribución de la des-represión de la proteína UBX al fenotipo de reducción del tamaño de ala se inactivaron conjuntamente los genes *Sce* y *Ubx* en discos de larvas *sd-GAL4/+; UAS-SceRNAi/UAS-UbxRNAi* y se estudió el fenotipo resultante de las alas. Se observó que el tamaño de las alas no estaba tan fuertemente reducido en comparación con alas de moscas *sd-GAL4/+; UAS-SceRNAi/UAS-GFP* (compárese **Figura 12B** con **12C**), aunque se siguió detectando expresión de C3 en los discos imaginales (**Figura 12D-D''**), por lo que la apoptosis no es el resultado de la des-represión de UBX. Lo que está de acuerdo con resultados previos que demuestran que la sobre-expresión de *Ubx* no produce apoptosis en el ala (Roch and Akam, 2000), al contrario de lo que ocurre en la morfogénesis neuronal (Rogulja-Ortmann et al., 2008). Por lo tanto, el fenotipo observado en las alas de moscas *sd-GAL4/+; UAS-SceRNAi/+* parece ser debido, principalmente, a la inducción de apoptosis como resultado de la inactivación del gen *Sce*. Aunque no se descarta la posibilidad de que, además, la inactivación de éste y otros genes *PcG* esté afectando a otras vías de señalización que regulen tamaño o división celular.

|                 | PROTEÍNAS  | FENOTIPO  | EXPRESION MARCADORES  |   |   |   | APOPTOSIS | HOX | PROLIFERACIÓN |
|-----------------|------------|---|---|---|---|---|-----------|-----|---------------|
|                 |            |   | a-C3  | a-UBX   | a-AbdB  | a-PH3   |           |     |               |
| INACTIVACIÓN    | dRING      |            |    |    |   |   | SI        | SI  | NO            |
|                 | PC         |            |    |    |   |   | SI        | SI  | NO            |
|                 | PCL        |            |    |    |   |   | SI        | SI  | NO            |
|                 | PSC        |  *         |    |    |   |   | NO        | NO  | NO            |
|                 | SU(Z)2     |            |   |   |   |   | nd        | nd  | nd            |
|                 | PSC/SU(Z)2 |  25°C      |    |    |   |   | SI        | SI  | SI            |
|                 | PH         |  25°C**    |    |    |  |    | SI        | SI  | SI            |
|                 | dRYBP      |  *       |   |   |   |   | SI        | NO  | NO            |
|                 | TRX        |  *       |   |   |   |   | nd        | nd  | nd            |
| SOBRE-EXPRESIÓN | dRING      |          |   |   |   |   | NO        | NO  | NO            |
|                 | PC         |          |   |   |   |   | NO        | NO  | NO            |
|                 | PH         |  25°C*** |  |  |   |  | SI        | SI  | SI            |
|                 | dRYBP      |          |  |  |   |   | SI        | SI  | NO            |
|                 | DSP1       |          |   |   |   |   | nd        | nd  | nd            |
|                 | TRX        |          |  |  |   |   | SI        | SI  | NO            |

**Tabla 6.- Efectos, en el ala, de la inactivación y de la sobre-expresión de las proteínas PcG/trxG.** Todas las imágenes de las alas de moscas adultas fueron tomadas al mismo aumento. La línea GAL4 utilizada fue *sd-GAL4*, salvo que se indique lo contrario (\*: *en-GAL4*; \*\*: *nb-GAL4*; \*\*\*: *hh-GAL4*). La temperatura a la cual se desarrollaron las moscas fue en la mayoría de los casos 29°C. Cuando fue a 25°C, esta indicado (25°C). *nd*: no determinado.

Las alas *sd-GAL4/+; UAS-Pc<sup>lRNAi</sup>/+* presentan también un tamaño muy reducido (**Tabla 6 y Figura 10D**). En este caso, los discos imaginales de ala *sd-GAL4/+; UAS-Pc<sup>lRNAi</sup>/+* también tienen un tamaño reducido como se observa en la **Figura 13E**, donde se puede apreciar la diferencia en la proporción entre el tamaño del disco de ala mutante (a) con el de pata III (p) o halterio (h), en relación al tamaño de un disco de ala silvestre (**Figura 13A**).

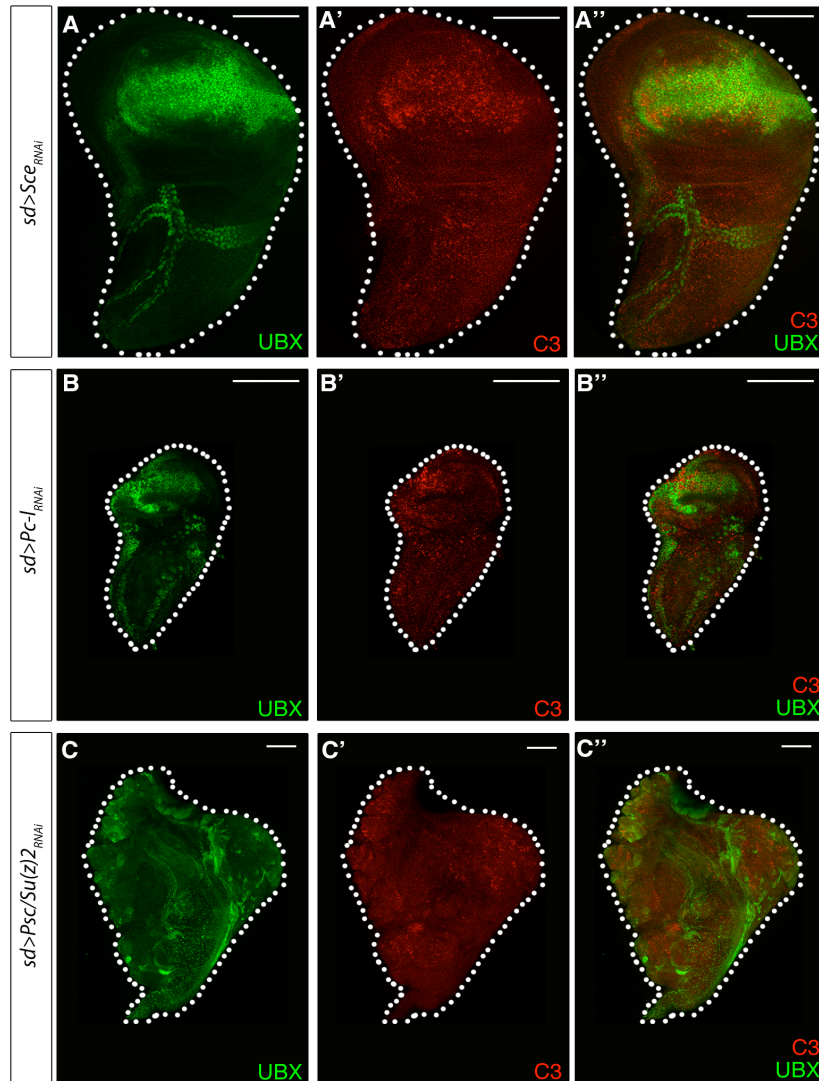


**Figura 10.** – Efecto de la inactivación de *Sce*, *Pc*, *Pc-l* y *Psc/Su(Z)2* en las alas. **A)** Ala silvestre (WT, *Wild Type*). **B)** Ala *sd-GAL4/+; UAS-Sce<sup>RNAi</sup>/+*. **B')** Ampliación de la imagen B. **C)** Ala *sd-GAL4/+; UAS-Pc<sup>RNAi</sup>/+*. **C')** Ampliación de la imagen C. **D)** Ala *sd-GAL4/+; UAS-Pc-l<sup>RNAi</sup>/+*. **E)** Ala *sd-GAL4/+; UAS-Psc<sup>RNAi</sup>/UAS-Su(z)2<sup>RNAi</sup>*.

La inactivación del gen *Psc* ó del gen *Su(z)2* produce tan sólo un ligero fenotipo en las alas, a diferencia del fenotipo que se observa cuando se inactivan conjuntamente (**Tabla 6 y Figura 14D**), indicando que estos genes tienen una función redundante, como ha sido previamente descrito (Lo et al., 2009). Las alas de las moscas *en-GAL4/+; UAS-Psc<sup>RNAi</sup>/+* tienen un tamaño ligeramente reducido y presentan manchas melanóticas y en la región de intervena IV-V aparece una vena ectópica (**Figura 14B**). Además, los discos imaginales de alas *sd-GAL4/+; UAS-Psc<sup>RNAi</sup>/+* no muestran ni expresión de C3 ni de UBX (**Tabla 6**). Por otro lado, alas de moscas *sd-GAL4/+; UAS-Su(z)2<sup>RNAi</sup>/+* presentan un tamaño reducido, en comparación con un ala silvestre, y venas malformadas (**Tabla 6 y Figura 14C**). Sin embargo, los discos imaginales de moscas *sd-GAL4/+; UAS-Psc<sup>RNAi</sup>/UAS-Su(z)2<sup>RNAi</sup>* están muy sobrecrecidos, a pesar de la activación de la expresión de C3 y de UBX (**Tabla 6 y Figura 11C-C''**). El hecho de que los discos imaginales de ala de las moscas *sd-GAL4/+; UAS-Psc<sup>RNAi</sup>/UAS-Su(z)2<sup>RNAi</sup>* estén sobrecrecidos sugiere que estos genes tienen un papel en el control de la proliferación, lo que concuerda con su función como supresores de tumores en vertebrados. Sin embargo, pese a la proliferación que se observa en los discos imaginales, las alas de las moscas que alcanzan el estadio adulto no crecen más de su tamaño normal, incluso son más pequeñas. Esto podría explicarse si se considera que el fenotipo de las alas de los individuos adultos son el resultado de la ganancia de la apoptosis frente a la proliferación celular que se produce durante el estadio

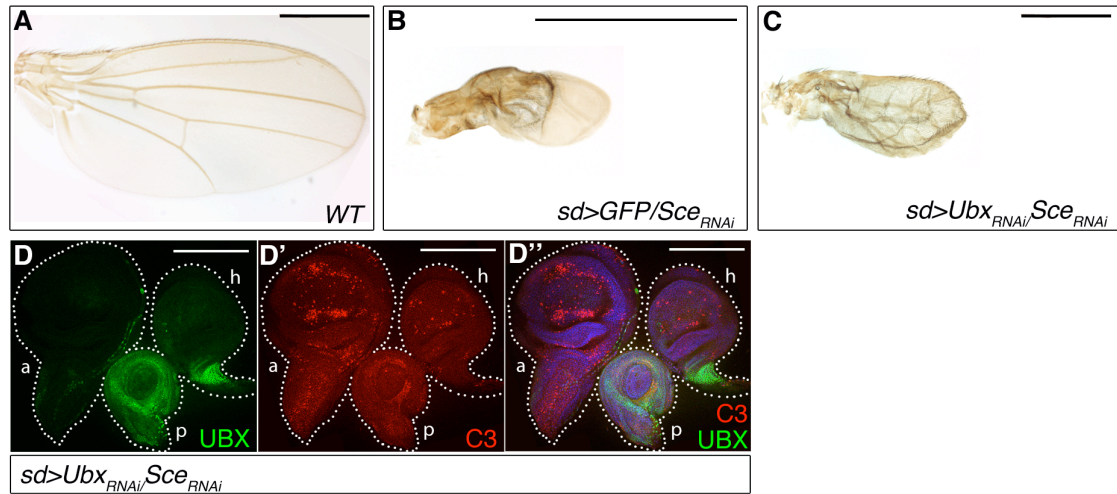


larvario, además de la des-represión de UBX que cambiaría la identidad de ala hacia halterio y, por tanto, se produce una disminución global del tamaño.



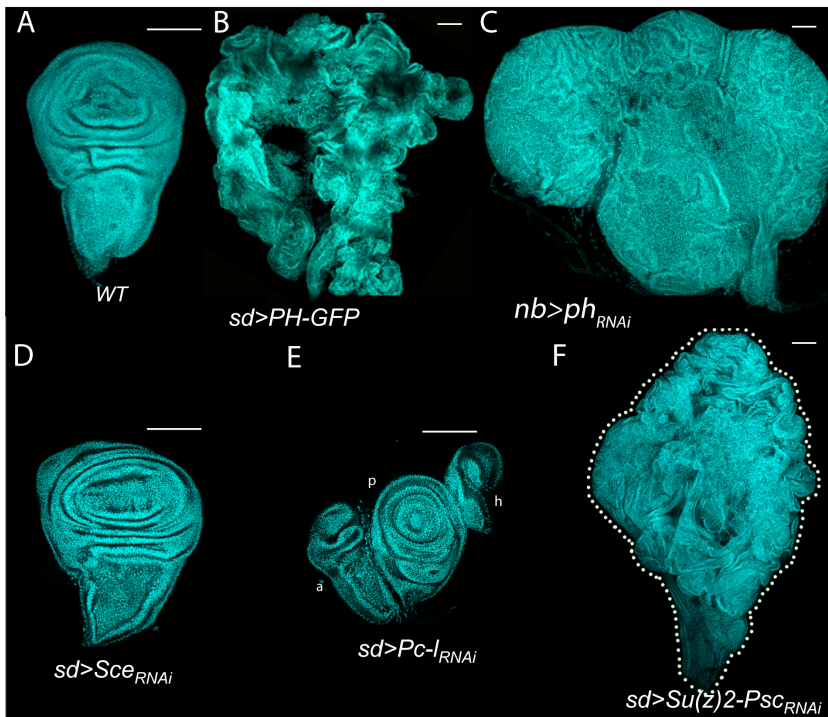
**Figura 11. - Efecto de la inactivación de *Sce*, *Pc-I* y *Psc/Su(Z)2* en la inducción de apoptosis y en la expresión de la proteína homeótica UBX en el disco imaginal de ala. (A-A'')** Discos imaginales de ala *sd-GAL4/+; UAS-SceRNAi/+*. **A)** Expresión de UBX (verde). **A')** Expresión de caspasa-3 activada (C3) (rojo). **A'')** Superposición de imágenes A y A'. **(B-B'')** Discos imaginales de ala *sd-GAL4/+; UAS-Pc-I RNAi/+*. **B)** Expresión de UBX (verde). **B')** Expresión de C3 (rojo). **B'')** Superposición de imágenes B y B'. **(C-C'')** Discos imaginales de alas *sd-GAL4/+; UAS-PscRNAi/UAS-Su(z)2RNAi*. **C)** Expresión de UBX (verde). **C')** Expresión C3 (rojo). **C'')** Superposición de imágenes C y C'.

Las moscas *sd-GAL4/+; UAS-trxRNAi/+* muestran alas de tamaño normal con la intervena III-IV afectada (Tabla 6). Sin embargo, su sobre-expresión produce alas totalmente transformadas a halterio, observándose una fuerte des-represión de UBX en el disco imaginal de ala y una fuerte inducción de apoptosis (Tabla 6). Estos resultados indican que la sobre-expresión de TRX, un miembro *trxG*, produce fenotipos similares a la inactivación de genes *PcG*, como *Sce* o *Pc*.

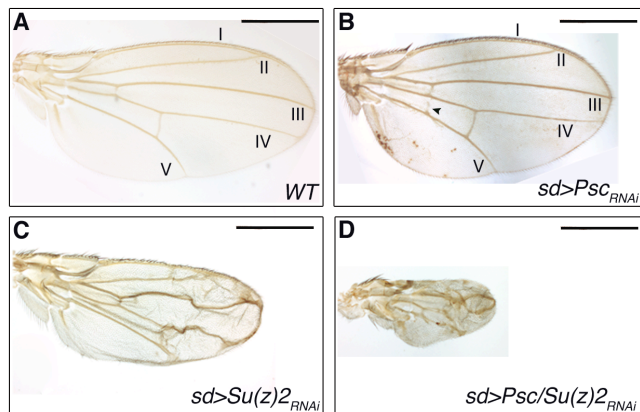


**Figura 12.- Efecto de la inactivación concomitante de Sce y de Ubx en el ala.** A) Ala silvestre (WT, *Wild Type*). B) Ala *sd-GAL4/+; UAS-SceRNAi/UAS-GFP*. C) Ala *sd-GAL4/+; UAS-SceRNAi/UAS-UbxRNAi*. (D-D'') Discos imaginales de ala (a), halterio (h) y pata metatorácica (p) *sd-GAL4/+; UAS-SceRNAi/UAS-UbxRNAi*. D) Expresión de UBX (verde). D') Expresión de caspasa-3 activada (C3) (rojo). D'') Superposición de imágenes D y D'.

Por último, la sobre-expresión de las proteínas PC, SCE y Dsp1 produce moscas con alas de tamaño normal (Tabla 6), si bien las alas de las moscas *sd-GAL4/+; UAS-Dsp1/+* presentaban venas ectópicas, engrosamiento de la vena 1 y con la aposición dorso-ventral afectada. Los discos imaginales de ala de las larvas *sd-GAL4/+; UAS-PC/+* y *sd-GAL4/+; UAS-SCE/+* no mostraron activación de la expresión de C3 ni des-represión de la proteína UBX.



**Figura 13.- Efectos de la inactivación de Sce, Pc-I, Psc/Su(Z)2, y ph y de la sobre-expresión de PH en los discos imaginales de ala.** A) Disco imaginal de ala silvestre (WT, *Wild Type*). B) Disco imaginal de ala *sd-GAL4/+; UAS-ph-GFP/+*. C) Disco imaginal de ala *nb-GAL4/+; UAS-phRNAi/+*. D) Disco imaginal de ala *sd-GAL4/+; UAS-SceRNAi/+*. E) Discos imaginales de ala (a), halterio (h) y pata III (p) *sd-GAL4/+; UAS-Pc-I RNAi*. F) Disco imaginal de ala *sd-GAL4/+; UAS-PscRNAi/UAS-Su(z)2RNAi*. En turquesa se muestra el marcador de núcleos T-pro3.



**Figura 14.- Efecto de la inactivación de *Psc*, *Su(z)2* y *Psc/Su(Z)2* en las alas.** A) Ala silvestre (WT, *Wild Type*). B) Ala *sd-GAL4/+; UAS-PscRNAi/+*. Nótese la presencia de una vena ectópica en la región de intervena IV-V (cabeza de flecha). C) Ala *sd-GAL4/+; UAS-Su(Z)2RNAi/+*. D) Ala *sd-GAL4/+; UAS-PscRNAi/UAS-Su(Z)2RNAi*.

En conjunto, todos estos resultados ponen de manifiesto la importancia que tiene el correcto mantenimiento de los niveles de expresión de los genes *PcG/trxG* para el adecuado desarrollo de *Drosophila*. Curiosamente, la falta de expresión de proteínas pertenecientes a un mismo complejo proteico, por ejemplo, el complejo PRC1, como son las proteínas SCE, PSC y SU(Z)2, pueden tener funciones distintas dentro del mismo contexto celular. Al menos en el ala, SCE estaría actuando principalmente como una proteína anti-apoptótica, mientras que las proteínas PSC y Su(z)2 estarían principalmente actuando como pro-apoptóticas.

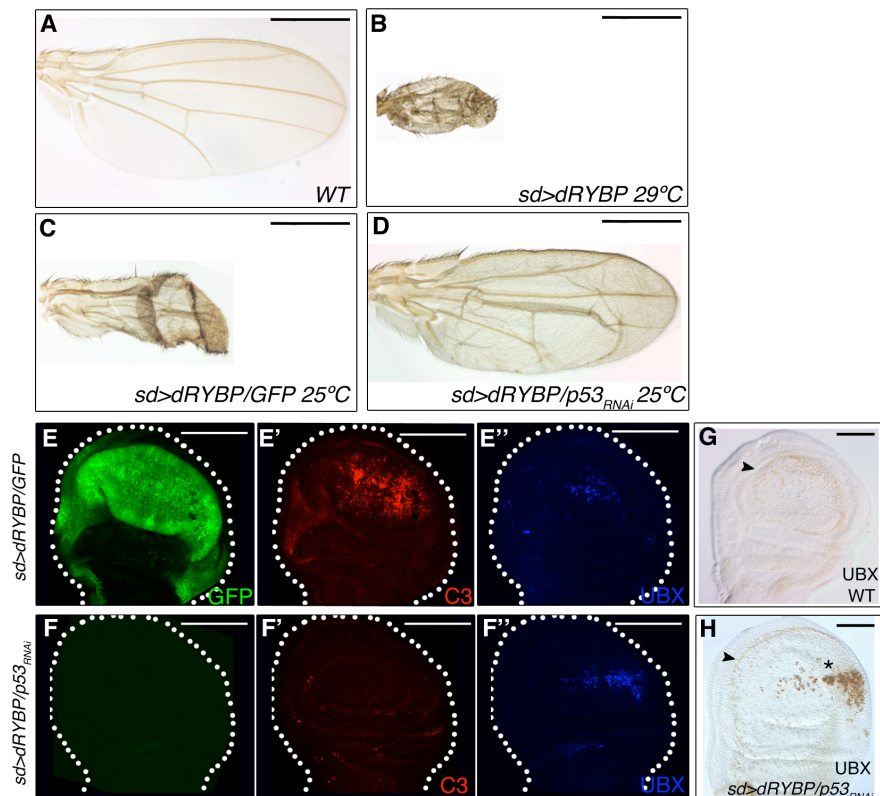
## 4.1.2.- Estudio de la función de dRYBP en los mecanismos de apoptosis.

### 4.1.2.1.- La sobre-expresión de dRYBP produce apoptosis dependiente de Dp53 y JNK.

Resultados previos obtenidos en el laboratorio muestran que la sobre-expresión de la proteína dRYBP induce apoptosis en los discos imaginales de la mosca y que esta apoptosis es modulada por varios factores, entre ellos la proteína TRX (Gonzalez and Busturia, 2009). Como puede observarse en la **Tabla 6** y **Figura 15B**, el fenotipo resultante en los individuos adultos se corresponde con alas de tamaño muy reducido, parcialmente transformadas a halterio, recordando a los fenotipos anteriormente descritos para la sobre-expresión de la proteína TRX y la inactivación de los genes *Sce*, *Pc*, *Pcl* (**Tabla 6** y **Figura 10**). De acuerdo al fenotipo observado de transformación hacia halterio de las alas de moscas *sd-GAL4/+; UAS-dRYBP/+*, se observó des-represión de UBX en los discos imaginales de ala (**Tabla 6** y **Figura 15E-E''**) (Gonzalez et al., 2008).

Curiosamente, la proteína RYBP de humanos sólo produce apoptosis en células transformadas (Danen-van Oorschot et al., 2004). Además, en condiciones de estrés celular, la proteína RYBP se comporta como un modulador negativo de la E3-ubiquitín ligasa MDM2 impidiendo que P53 se ubiquitine y, por tanto, que se degrade vía

proteasoma, estabilizando así los niveles de P53 para inducir apoptosis (Chen et al., 2009). Para profundizar más en detalle sobre la función de la proteína dRYBP en los mecanismos de apoptosis en *Drosophila*, se analizó si la apoptosis producida por los altos niveles de dRYBP eran o no dependientes de *Dp53*. Por otro lado, se analizó si esta apoptosis estaba o no asociada a la activación de la vía JNK (*Jun N-terminal kinase*), puesto que dicha vía también está implicada en los mecanismos de inducción de apoptosis en respuesta a estrés (revisado en (Igaki, 2009; Kanda and Miura, 2004)). Tanto la vía JNK como *Dp53* actúan “upstream” y “downstream” de la cascada apoptótica (Shlevkov and Morata, 2012).



**Figura 15.- Efecto de la inactivación de *Dp53* en la apoptosis inducida por altos niveles de dRYBP en el ala. A)** Ala silvestre (WT, *Wild Type*). **B)** Ala *sd-GAL4/+; UAS-dRYBP/+* (desarrolladas a 29°C). **C)** Ala *sd-GAL4/+; UAS-dRYBP/UAS-GFP* (desarrolladas a 25°C). **D)** Ala *sd-GAL4/+; UAS-dRYBP/UAS-Dp53<sup>RNAi</sup>* (desarrolladas a 25°C). Compárese la diferencia de tamaño entre D y C, indicando un rescate del fenotipo apoptótico. **(E-E'')** Discos imaginales de ala *sd-GAL4/+; UAS-dRYBP/UAS-GFP*. **E)** Expresión de GFP (verde). **E')** Expresión de caspasa-3 activada (C3) (rojo). **E'')** Expresión de UBX (azul). **(F-F'')** Discos imaginales de ala *sd-GAL4/+; UAS-dRYBP/UAS-Dp53<sup>RNAi</sup>*. **F)** Expresión de caspasa-3 activada (C3) (rojo). **F')** Expresión de UBX (azul). **G)** Disco imaginal de ala silvestre mostrando la expresión de UBX en la membrana peripodial (cabeza de flecha). **H)** Disco imaginal de ala *sd-GAL4/+; UAS-dRYBP/UAS-Dp53<sup>RNAi</sup>* mostrando la expresión de UBX en la membrana peripodial (cabeza de flecha) y en las células del disco propio (asterisco).

## 4.1.2.1.1.- La apoptosis producida por la sobre-expresión de dRYBP es dependiente de la proteína *Dp53*.

Se analizó la expresión de C3 en los discos imaginales de ala *sd-GAL4/+; UAS-dRYBP/UAS-Dp53<sup>RNAi</sup>* y se comparó con la expresión de C3 en discos *sd-GAL4/+; UAS-*

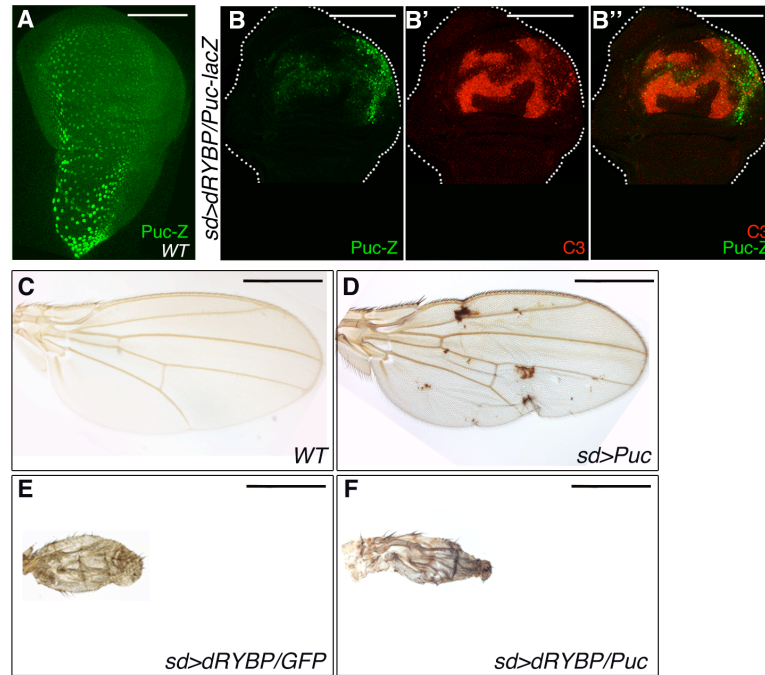


*dRYBP/UAS-GFP*. Como se muestra en la **Figura 15F'**, los discos *sd-GAL4/+; UAS-dRYBP/UAS-Dp53<sup>RNAi</sup>* presentan una menor expresión de C3 comparado con los discos *sd-GAL4/+; UAS-dRYBP/UAS-GFP*, lo que concuerda con el rescate del fenotipo en las alas de las moscas *sd-GAL4/+; UAS-dRYBP/UAS-Dp53<sup>RNAi</sup>* (compárese **Figura 15C** con **15D**). Estos resultados indican que la apoptosis inducida por los altos niveles de dRYBP dependen de los niveles de expresión de la proteína Dp53, sugiriendo que la proteína dRYBP podría estar involucrada en los mecanismos de respuesta a estrés mediados por Dp53.

Como la sobre-expresión de dRYBP inducía la des-represión de UBX en el disco de ala (Gonzalez and Busturia, 2009) (**Tabla 6** y **Figura 15E''**), se decidió analizar si la expresión de UBX se modulaba en discos imaginales de ala *sd-GAL4/+; UAS-dRYBP/UAS-Dp53<sup>RNAi</sup>*. Como puede observarse en la **Figura 15F''** y **15G** la des-represión de UBX sigue teniendo lugar tanto en discos de ala *sd-GAL4/+; UAS-dRYBP/UAS-Dp53<sup>RNAi</sup>* como *sd-GAL4/+; UAS-dRYBP/UAS-GFP*, lo que indica que la falta de función de *Dp53* no suprime la des-represión de UBX en el ala. Por tanto, el rescate del fenotipo del ala (**Figura 15D**) es debido fundamentalmente al rescate de la apoptosis debido a la inactivación de *Dp53*.

#### 4.1.2.1.2.- La apoptosis producida por la sobre-expresión de dRYBP está asociada a la activación de la vía JNK.

Se analizó la expresión de la  $\beta$ -galactosidasa en discos imaginales de ala y de halterio de larvas *sd-GAL4/+; UAS-dRYBP/puc-lacZ*, donde *puc-lacZ* actúa como reportero de la expresión de *Puckered*, observándose expresión ectópica de  $\beta$ -galactosidasa en el disco propio comparado con discos control *sd-GAL4/+; puc-lacZ/+*, en los que sólo se observa expresión de  $\beta$ -galactosidasa en la membrana peripodial (compárese **Figura 16A** con **16B**). Estos resultados indican que la apoptosis producida por los altos niveles de dRYBP está asociada a la activación de la vía JNK. A continuación, se analizó si la sobre-expresión de *Puckered*, que además de inducirse por la activación de la vía JNK, actúa como retro-inhibidor de la misma (Martin-Blanco et al., 1998), rescataba el fenotipo de sobre-expresión de dRYBP en los individuos adultos. Como se muestra en la **Figura 16F**, no se observó rescate del fenotipo en moscas *sd-GAL4/+; UAS-Puc/+; UAS-dRYBP/+* comparado con moscas *sd-GAL4/+; UAS-GFP/UAS-dRYBP*, indicando que la activación de la vía JNK no es la principal vía responsable del fenotipo que se observa en las alas *sd-GAL4/+; UAS-dRYBP/+*.



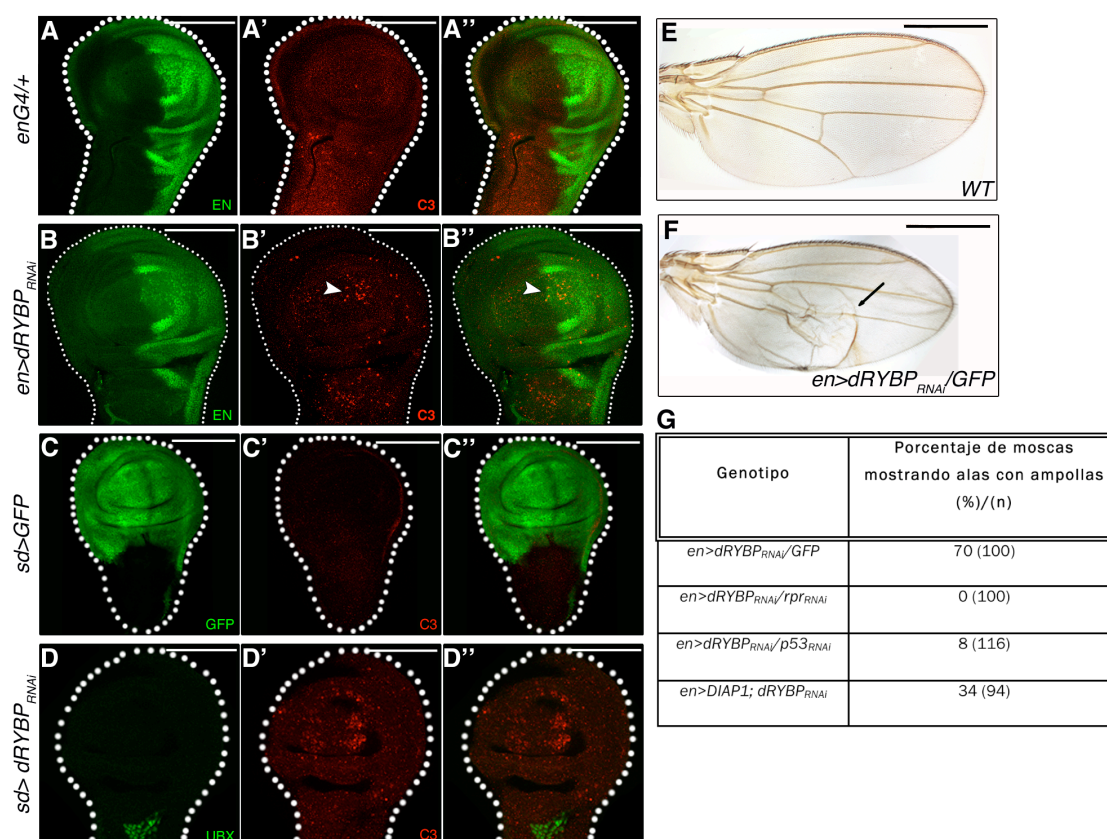
**Figura 16.- La sobre-expresión de dRYBP induce apoptosis asociada a la activación de la vía JNK.** A) Disco imaginal de ala *Puc-lacZ/+* mostrando expresión de lacZ (verde) en la membrana peripodial. (B-B'') Discos imaginales de ala *sd-GAL4/+; UAS-dRYBP/Puc-lacZ*. B) Expresión de lacZ (verde). B') Expresión de caspasa-3 activada (rojo). B'') Superposición de imágenes B y B'. C) Ala silvestre (WT, *Wild Type*). D) Ala *sd-GAL4/+; UAS-Puc/+*. E) Ala *sd-GAL4/+; UAS-dRYBP/UAS-GFP*. F) Ala *sd-GAL4/+; UAS-dRYBP/UAS-Puc*.

#### 4.1.2.2.- La inactivación de dRYBP induce apoptosis.

Se estudió si la falta de función de dRYBP en discos imaginales de ala de larvas *en-GAL4/+; UAS-dRYBP<sup>RNAi</sup>/+* presentaban expresión de C3 en las células del compartimento posterior comparado con la expresión de C3 en discos control *en-GAL4/+*. Como puede observarse en la **Figura 17B-B''**, la inactivación de dRYBP induce la expresión de C3 en el compartimento posterior, marcado con el anticuerpo anti-*engrailed*, indicando que, aunque a bajos niveles, la falta de función de dRYBP induce apoptosis en los discos imaginales de ala. También se observó un aumento de la expresión de C3 en discos *sd-GAL4/+; UAS-dRYBP<sup>RNAi</sup>/+* comparado con discos *sd-GAL4/+* (compárese **Figura 17C'** con **17D'**). En ningún caso se observó des-represión de UBX (**Figura 17D**). Además, las alas de moscas *en-GAL4; UAS-dRYBP<sup>RNAi</sup>/UAS-GFP*, crecidas a 29°C, mostraban ampollas, con una penetrancia del 70% (**Figura 17F-G**). Este fenotipo bien podría relacionarse con la inducción de apoptosis (Dichtel-Danjou et al., 2013) debida a la inactivación de dRYBP. Estos resultados sugieren que, en condiciones silvestres, dRYBP estaría actuando como un factor anti-apoptótico.

Para estudiar los factores que podrían estar implicados en la apoptosis producida por la inactivación de dRYBP, se decidió analizar la modulación de la penetrancia del fenotipo de ampollas en las alas de las moscas *en-GAL4/+; UAS-*

*dRYBP<sup>RNAi</sup>/UAS-GFP* (Figura 17F) en distintos fondos mutantes para genes involucrados en los mecanismos que controlan la apoptosis. Así, se analizó cómo la inactivación de los factores pro-apoptóticos *Dp53* y *rpr*, por una lado, y la sobre-expresión de la proteína anti-apoptótica DIAP1, por otro lado, modulaban la penetrancia del fenotipo de ampolla en las alas de moscas: *en-GAL4/+; UAS-dRYBP<sup>RNAi</sup>/UAS-p53<sup>RNAi</sup>*; *en-GAL4/+; UAS-dRYBP<sup>RNAi</sup>/UAS-rpr<sup>RNAi</sup>* y *en-GAL4/ UAS-DIAP1; UAS-dRYBP<sup>RNAi</sup>/+*, comparado con las moscas *en-GAL4/+; UAS-dRYBP<sup>RNAi</sup>/UAS-GFP* (Figura 17G). Los datos mostrados en la Figura 17G indican que la apoptosis inducida por la inactivación de *dRYBP* es dependiente de los niveles de expresión de *Dp53* y *rpr* y también de la proteína DIAP1.



**Figura 17.- La inactivación de dRYBP induce apoptosis.** (A-A'') Discos imaginales de ala *en-GAL4/+*. **A)** Expresión de Engrailed (verde) marcando el compartimento posterior. **A')** Expresión de caspasa-3 activada (C3) (rojo). **A'')** Superposición de imágenes A y A'. **(B-B'')** Discos imaginales de ala *en-GAL4/+; UAS-dRYBP<sup>RNAi</sup>/+*. **B)** Expresión de Engrailed (verde). **B')** Expresión de C3 (rojo). Nótese la presencia de células apoptóticas (cabeza de flecha) en comparación con A'. **B'')** Superposición de imágenes B y B'. La cabeza de flecha indica las células apoptóticas que se localizan dentro del compartimento posterior (verde), donde dRYBP está inactivado. **(C-C'')** Discos imaginales de ala *sd-GAL4/+; UAS-GFP/+*. **C)** Expresión de GFP (verde) marcando el dominio de expresión de sd-GAL4. **C')** Expresión de C3 (rojo). **C'')** Superposición de imágenes C y C'. **(D-D'')** Discos imaginales de ala *sd-GAL4/+; UAS-dRYBP<sup>RNAi</sup>/+*. **D)** Expresión de UBX (verde). **D')** Expresión de C3 (rojo). **D'')** Superposición de imágenes D y D'. **E)** Ala silvestre (WT, *Wild Type*). **F)** Ala *en-GAL4/+; UAS-dRYBP<sup>RNAi</sup>/UAS-GFP* ampollada (flecha) en el compartimento posterior donde está inactivado dRYBP. **G)** Tabla mostrando la modulación de la penetrancia del fenotipo de ampolla en el ala de los genotipos indicados.

Tomados en su conjunto, todos estos resultados indican que la proteína dRYBP tiene un importante papel en la regulación de la apoptosis en *Drosophila*, ya que, tanto altos como bajos niveles, inducen apoptosis en los discos imaginales de la mosca. En

condiciones normales, dRYBP actuaría inhibiendo la apoptosis, actuando como un factor anti-apoptótico,

### 4.1.3.- Estudio de la función de la proteína Polyhomeotic (PH) en los mecanismos de proliferación y apoptosis

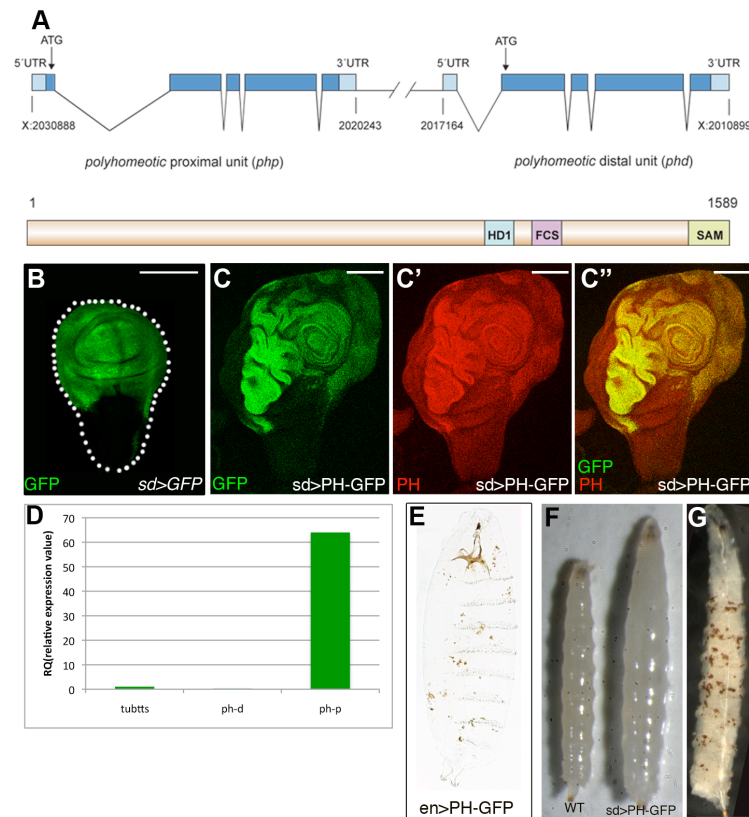
El locus del gen *polyhomeotic* consta de dos unidades de transcripción que codifican para las proteínas homólogas Polyhomeotic proximal (PH-p) y Polyhomeotic distal (PH-d) (**Figura 18A**), ambas de expresión ubicua a lo largo del desarrollo (Franke et al., 1992). La proteína PH contiene un dominio SAM (Sterile Alpha Motif) en su región C-terminal (Kim et al., 2002) con capacidad para asociarse consigo mismo (Carroll et al., 1996), interaccionar con otras proteínas conteniendo el dominio SAM (Tu et al., 1997) (Potter et al., 2000) o no (Zhang et al., 2000). Además, la proteína PH es glicosilada por la enzima glicosiltransferasa OGT (O-Glicosil-Transferasa), codificada por el gen *sxc* (*super sex comb*) perteneciente al grupo PcG, siendo esta glicosilación importante para su función represora (Gambetta et al., 2009).

#### 4.1.3.1.- Efectos de la sobre-expresión de la proteína PH en la proliferación celular

Se sobre-expresó la proteína PH-p en el embrión y en los discos imaginales de las larvas usando el sistema UAS/GAL4 (Brand et al., 1994). En primer lugar, se comprobó que en las condiciones experimentales utilizadas, efectivamente, se producía un aumento de los niveles de expresión de la proteína PH. Para ello se analizó, por una lado, la expresión de PH mediante tinciones con el anticuerpo anti-PH de discos imaginales de ala *sd-GAL4/+; UAS-ph-EGFP<sub>m20</sub>/+*. Como se observa en la **Figura 18C'**, la expresión de PH esta aumentada en todo el dominio *sd-GAL4*, correspondiente a todo el “wing pouch”. Por otro lado, se analizó la expresión del ARNm de *ph* mediante qRT-PCR cuantitativa a partir de discos imaginales de ala de larvas *sd-GAL4/+; UAS-ph-EGFP<sub>m20</sub>/+*, obteniéndose un aumento de 64 veces para el ARNm *ph-p* en comparación con la expresión en larvas control (**Figura 18D**). A continuación, se analizaron los efectos de la sobre-expresión de PH en los estadios embrionarios. Los embriones *en-GAL4/+; UAS-ph-EGFP<sub>m20</sub>/+* presentaban manchas melanóticas en la cutícula y fallos en la organización de los dentículos, causando letalidad (**Figura 18E**). En los estadios larvarios, la sobre-expresión de PH producía retraso en el desarrollo, observándose que las larvas *sd-GAL4/+; UAS-ph-EGFP<sub>m20</sub>/+* permanecían en tercer estadio larvario hasta varias semanas e incluso más de un mes si el cruce se mantenía a 17°C. Además, estas larvas eran considerablemente más grandes que las larvas silvestres en el mismo estadio y, en ocasiones, presentaban manchas melanóticas en la cutícula (**Figura 18F-G**), raramente alcanzaban el estadio pupal y cuando lo hacían morían pronto. Variando las condiciones de temperatura y



dependiendo de la línea GAL4 utilizada en cada caso se consiguió que algunos descendientes llegasen al estadio adulto, como se describirá más adelante.



**Figura 18.- Efecto de la sobre-expresión de PH en la morfogénesis. A)** Mapa del locus del gen *ph* mostrando las unidades de transcripción de *ph-p* y *ph-d* y de la estructura de la proteína PH. Los dominios proteicos conservados HD1, FCS-Zn Finger y SAM aparecen indicados. **B)** Disco imaginal de ala *sd-GAL4/+; UAS-GFP/+* mostrando expresión de GFP (verde), indicativo del dominio de expresión de *scalloped*. **(C-C')** Discos imaginales de ala *sd-GAL4/+; UAS-PH-GFP<sub>m20</sub>/+*. **C)** Expresión de GFP (verde). **C')** Expresión de PH (rojo). **C'')** Superposición de imágenes C y C'. **D)** Gráfico mostrando los niveles relativos del ARNm de *ph* obtenidos mediante PCR cuantitativa en discos imaginales de alas de los genotipos indicados. **E)** Embrión *en-GAL4/+; UAS-PH-GFP<sub>m20</sub>/+*. Nótese la presencia de manchas melanóticas en la cutícula. **F)** Comparación de tamaño entre una larva silvestre (WT) (izquierda) y una larva *sd-GAL4/+; UAS-PH-GFP<sub>m20</sub>/+* (derecha) en tercer estadio. **G)** Larva *sd-GAL4/+; UAS-PH-GFP<sub>m20</sub>/+* mostrando manchas melanóticas en la cutícula. E, F y G no están a escala.

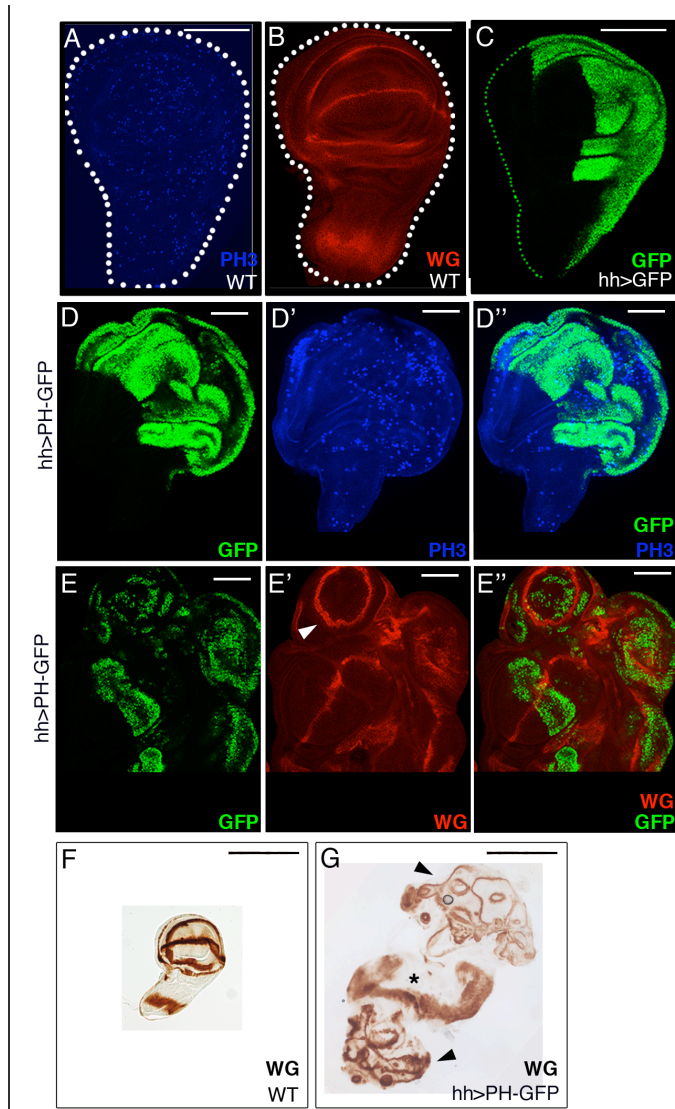
#### 4.1.3.1.1.- La sobre-expresión de PH produce proliferación hiperplásica en los discos imaginales de ala

Se analizaron los discos imaginales de ala de las larvas *sd-GAL4/+; UAS-ph-EGFP<sub>m20</sub>/+* y se observó que éstos estaban muy sobrecrecidos (**Tabla 6, Figura 18C-C''** y **Figura 19**). Para caracterizar estos sobrecrecimientos se estudió la expresión de PH3, marcador de mitosis (Tapia et al., 2006), y se observó un alto índice mitótico (**Tabla 6** y **Figura 19D'**). Además, también se analizó la expresión de Wingless (WG) en discos *tub-GAL80<sup>ts</sup>/+; hh-GAL4/UAS-ph-EGFP<sub>m20</sub>* y *sd-GAL4/+; UAS-ph-EGFP<sub>m20</sub>/+* y se observó la aparición de anillos ectópicos de expresión de WG que se correspondían con duplicaciones del *wing pouch*, que es la región del disco imaginal de ala que dará lugar al ala adulta propiamente dicha (**Figura 19E'** y **Figura 19G**). Debido a este elevado índice de

proliferación, se decidió analizar la integridad del epitelio de los discos imaginales sobrecrecidos. Para ello se analizó la expresión del marcador celular de membrana Faloidina (Small et al., 1988) en discos de larvas *sd-GAL4/+; UAS-ph-EGFP<sub>m20</sub>/+*, observándose que la membrana del epitelio no estaba afectada (**Figura 20A'**). También se estudió la expresión de las proteínas Crumbs y Disc large como marcadores de la polaridad apico basal celular (Dow and Humbert, 2007; Tepass et al., 2001) en discos *tub-GAL80<sup>ts</sup>/+; hh-GAL4/UAS-ph-EGFP<sub>m20</sub>*. Como se observa en la **Figura 20C**, la expresión de Disc large no está deslocalizada, concluyéndose que la polaridad no está afectada y sugiriendo, por tanto, que los crecimientos debidos a los altos niveles de expresión de PH son de tipo hiperplásico. Además, también se analizó si los sobrecrecimientos eran capaces de reclutar hemocitos, ya que los hemocitos son células del sistema hematopoyético que circulan libremente por la hemolinfa y que desempeñan una importante función en la remodelación de tejidos durante el desarrollo (Williams, 2007) y su reclutamiento a los tejidos ocurre cuando la integridad de la membrana basal está comprometida (Minakhina and Steward, 2006). Se tiñeron discos imaginales de ala de larvas *sd-GAL4/+; UAS-ph-EGFP<sub>m20</sub>/+* con el anticuerpo anti-Hemese, marcador de membrana general de hemocitos (Kurucz et al., 2003), y se observó que no se reclutaban hemocitos al tejido de ala sobrecrecido (**Figura 20B'**), si bien podía observarse algún hemocito pegado al epitelio debido a que los discos imaginales se encuentran en contacto con la hemolinfa.

### 4.1.3.1.2.- La sobre-expresión de PH produce apoptosis en los discos imaginales de ala:

Muchos de los procesos de proliferación y tumorigénesis también conllevan la inducción de apoptosis (Vaccari and Bilder, 2009) (**Tabla 6**). Se analizó si discos *sd-GAL4/+; UAS-ph-EGFP<sub>m20</sub>/+*, además de altos índices de proliferación, también presentaban altos índices de apoptosis. Como se observa en la **Figura 21F-F''** y **Tabla 6**, los discos *sd-GAL4/+; UAS-ph-EGFP<sub>m20</sub>/+* muestran altos niveles de expresión de C3. Además, se observó activación de la vía JNK detectado por un aumento de la expresión de *puckered-lacZ* (**Figura 21G-G''**). Por último, también se observó un aumento en la expresión de *rpr-lacZ* (**Figura 21H-H''**), usado como gen reportero de la expresión del gen proapoptótico *rpr*. Estos resultados indican que la sobre-expresión de PH además de producir proliferación, también produce apoptosis mediada por la activación del gen proapoptótico *rpr* y de la vía JNK.

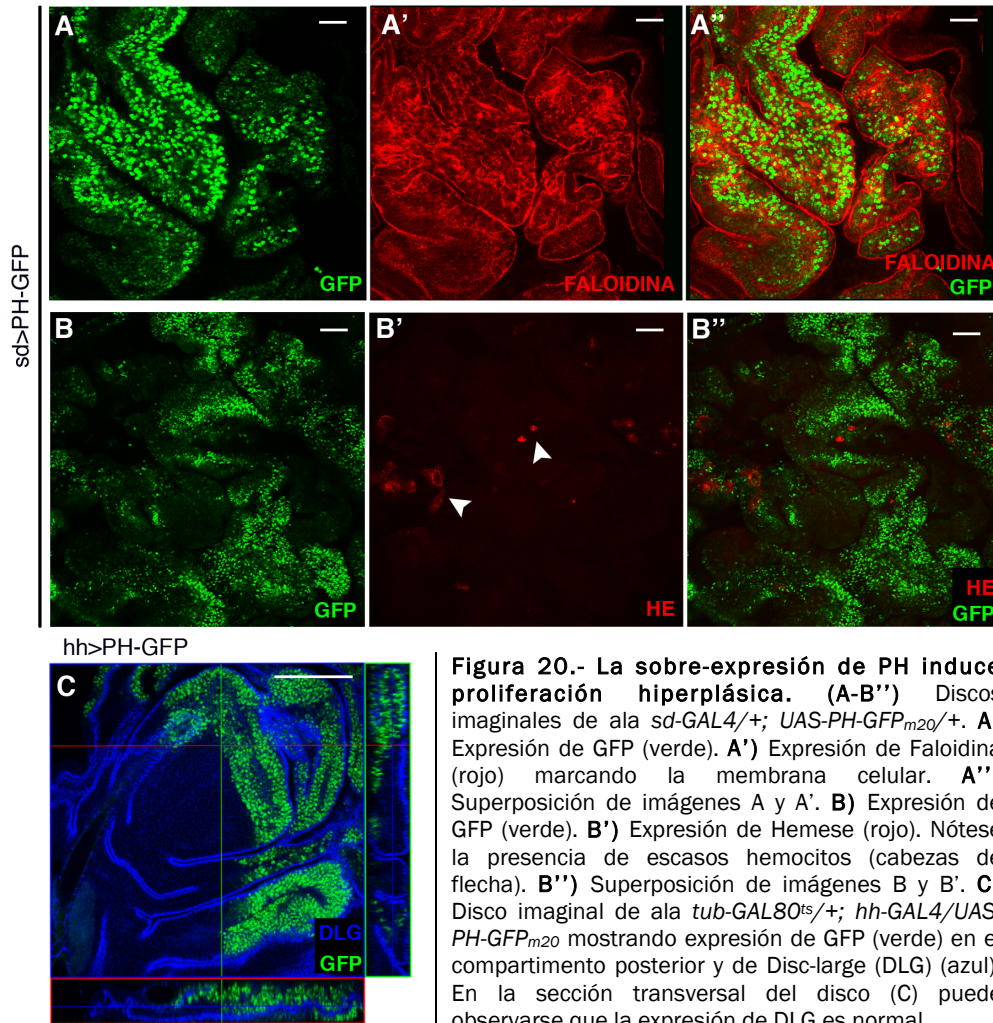


**Figura 19.- Efecto de la sobre-expresión de PH en la proliferación de los discos imaginales.** A) Disco imaginal de ala silvestre mostrando expresión de fosfo-histona 3 (PH3) (azul). B) Disco imaginal de ala silvestre mostrando expresión de Wingless (rojo). C) Disco imaginal de ala *hh-GAL4/UAS-GFP* mostrando expresión de GFP (verde) en el compartimento posterior, indicativo de la expresión de *hedgehog* (*hh*). (D-E'') Discos imaginales de ala *tub-GAL80<sup>ts</sup>/+; hh-GAL4/UAS-PH-GFP<sub>m20</sub>*. D) Expresión de GFP (verde). D') Expresión de fosfo-histona-3 (PH3) (azul). Nótese el incremento en proliferación de las células del compartimento posterior. D'') Superposición de las imágenes D y D'. E) Expresión de GFP (verde). E') Expresión de Wingless (WG) (rojo). Nótese la formación de anillos ectópicos de WG (cabeza de flecha). E'') Superposición de las imágenes E y E'. F) Disco imaginal de ala silvestre mostrando expresión de WG (marrón). G) Disco imaginal de ala *tub-GAL80<sup>ts</sup>/+; hh-GAL4/UAS-PH-GFP<sub>m20</sub>* mostrando expresión de WG (marrón). Nótese la diferencia de tamaño entre los discos F y G. La presencia de múltiples anillos ectópicos de WG (cabezas de flecha) y el tamaño del notum (asterisco) indican que el disco imaginal está duplicado.

#### 4.1.3.2.- Altos niveles de PH inducen transformaciones homeóticas.

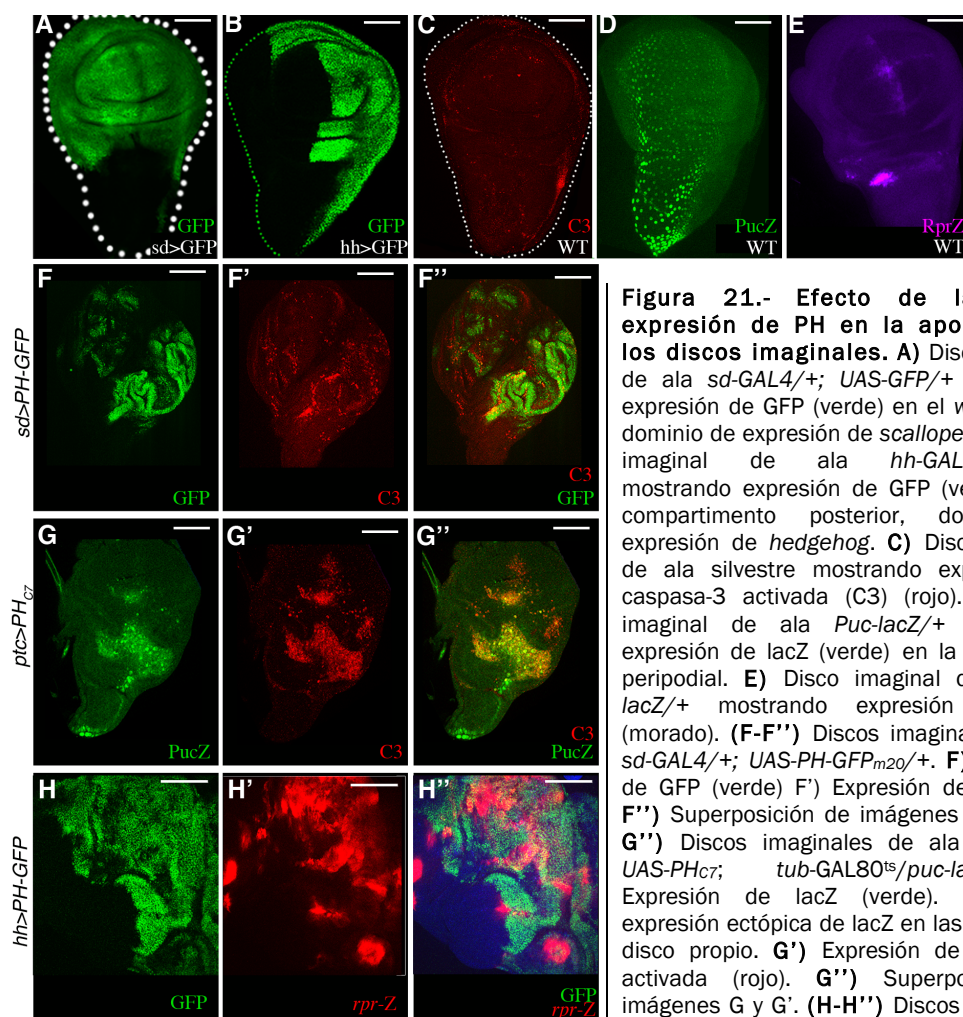
Se estudió si los discos imaginales con altos niveles de expresión de la proteína PH eran capaces de diferenciar a tejidos adultos. Para ello, se sobre-expresó la proteína PH usando el sistema GAL4/GAL80<sup>ts</sup> (Lue et al., 1987), cruzando moscas *tub-GAL80<sup>ts</sup>/CyO; hh-GAL4* con moscas *UAS-ph-EGFP<sub>m20</sub>*. Se observó que las alas de las moscas *tub-GAL80<sup>ts</sup>/+; hh-GAL4/UAS-ph-EGFP<sub>m20</sub>* mostraban en general un tamaño mayor que las alas de moscas silvestres, una vez que habían sido cuidadosamente extendidas, y además, presentaban transformaciones homeóticas, como indicaba la presencia de tricomas característicos de halterio en el compartimento posterior del ala, donde se localizaban los altos niveles de PH (Figura 22E). Los halterios de moscas *tub-GAL80<sup>ts</sup>/CyO; hh-GAL4/UAS-ph-EGFP<sub>m20</sub>* mostraron transformaciones parciales hacia alas, como indicaba su tamaño incrementado respecto a un halterio silvestre, su forma y la presencia de tricomas característicos de ala (Figura 22G y H). Por tanto, la sobre-expresión de PH en el halterio producía fenotipos

característicos de falta de función de genes del grupo *trxG*, mientras que en el ala, producía fenotipos similares a los producidos por la inactivación de genes *PcG*.



La transformación de halterio en ala sugería que la expresión de la proteína UBX podría estar alterada ya que, como se ha descrito anteriormente, en individuos silvestres, la proteína UBX se expresa en el halterio pero no en el ala con la excepción de las células de la membrana peripodial (White and Wilcox, 1984). Se decidió analizar la expresión de UBX en discos de halterio de larvas tanto *tub-GAL80<sup>ts</sup>/+; hh-GAL4/UAS-ph-EGFP<sub>m20</sub>* como *sd-GAL4/+; UAS-ph-EGFP<sub>m20</sub>/+* y también en clones de ganancia de función de *ph* mediante el uso del stock *hs-FLP; actina <y> GAL4, UAS GFP* (ver materiales y métodos). En todos los casos, observamos que la expresión de UBX estaba reprimida en aquellas células o clones del halterio donde se estaba sobreexpresando PH (**Figura 22A-A''**), explicando, por tanto, la transformación hacia ala de los halterios de las moscas.

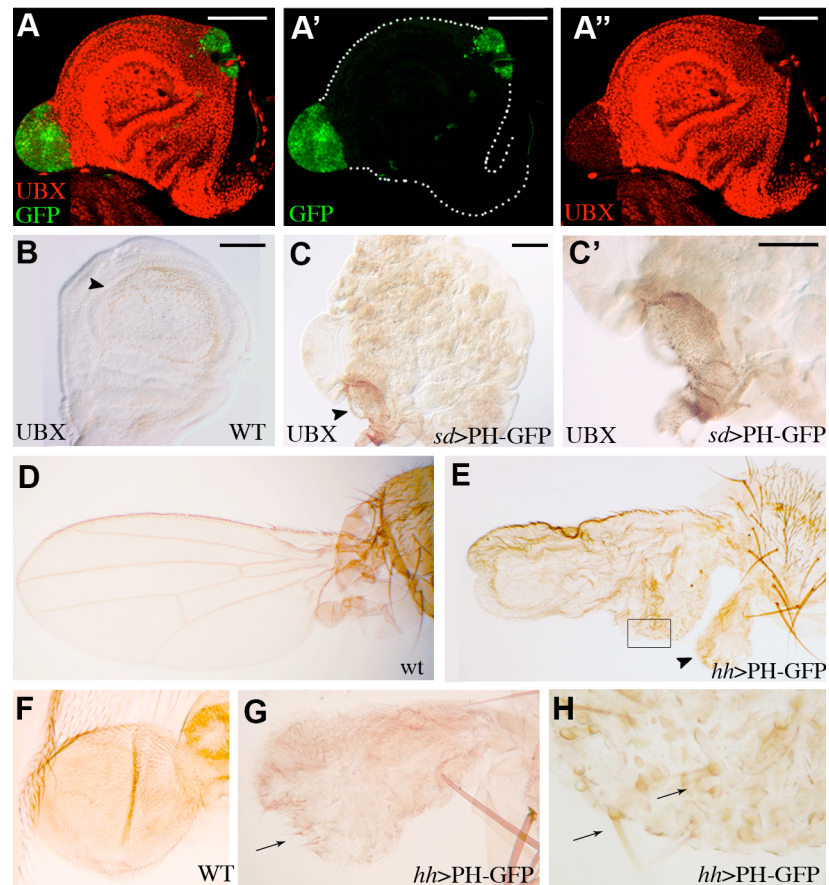




**Figura 21.- Efecto de la sobre-expresión de PH en la apoptosis de los discos imaginales.** **A)** Disco imaginal de ala *sd-GAL4/+; UAS-GFP/+* mostrando expresión de GFP (verde) en el *wing pouch*, dominio de expresión de *scalloped*. **B)** Disco imaginal de ala *hh-GAL4/UAS-GFP* mostrando expresión de GFP (verde) en el compartimento posterior, dominio de expresión de *hedgehog*. **C)** Disco imaginal de ala silvestre mostrando expresión de caspasa-3 activada (C3) (rojo). **D)** Disco imaginal de ala *Puc-lacZ/+* mostrando expresión de lacZ (verde) en la membrana peripodial. **E)** Disco imaginal de ala *rpr-lacZ/+* mostrando expresión de lacZ (morado). **(F-F'')** Discos imaginales de ala *sd-GAL4/+; UAS-PH-GFP<sub>m20</sub>/+*. **F)** Expresión de GFP (verde) **F')** Expresión de C3 (rojo). **F'')** Superposición de imágenes F y F'. **(G-G'')** Discos imaginales de ala *ptc>PH<sub>C7</sub>; tub-GAL80<sup>ts</sup>/puc-lacZ*. **G)** Expresión de lacZ (verde). Nótese la expresión ectópica de lacZ en las células del disco propio. **G')** Expresión de caspasa-3 activada (rojo). **G'')** Superposición de imágenes G y G'. **(H-H'')** Discos imaginales de ala *tub-GAL80<sup>ts</sup>/+; hh-GAL4/UAS-PH-GFP*.

**| H)** Expresión de GFP (verde). **H')** Expresión de lacZ (rojo). **H'')** Superposición de imágenes H y H'.

En los discos de ala *sd-GAL4/+; UAS-ph-EGFP<sub>m20</sub>/+* se observó una débil expresión de UBX, lo que estaría indicando que altos niveles de PH en el disco imaginal de ala des-reprime, aunque débilmente, la expresión de UBX (**Figura 22C-C'** y **Tabla 6**). Puesto que los genes homeóticos se regulan transcripcionalmente unos a otros siguiendo la regla de la “prevalencia posterior” (Busturia et al., 1989; Gonzalez-Reyes et al., 1990), por ejemplo, dentro del complejo BX-C, *Abd-B* reprimiría la expresión del gen *abd-A*, y a su vez, la del gen *Ubx*, se analizó la expresión de ABD-B en los discos *sd-GAL4/+; UAS-ph-EGFP<sub>m20</sub>/+*. Se encontró que la débil expresión de UBX en el ala era independiente de la regulación por *Abd-B*, puesto que no se detectó expresión de la proteína ABD-B en los discos imaginales de ala *sd-GAL4/+; UAS-ph-EGFP<sub>m20</sub>/+* (datos no mostrados).



**Figura 22.- La sobre-expresión de PH induce transformaciones homeóticas.** **A)** Superposición de las imágenes A' y A'' en un disco de halterio *hsFLP; act<y+>GAL4, UAS-GFP/UAS-PH<sub>C7</sub>* mostrando los clones de sobre-expresión de PH marcados con GFP (verde) y la expresión de UBX (rojo). **A')** Clones de sobre-expresión de PH marcados con GFP (verde) en el mismo disco. **A'')** Expresión de UBX (rojo) en el mismo disco. **B)** Expresión de UBX en la membrana peripodial en un disco de ala silvestre. **(C-C')** Expresión de UBX en un disco de ala *sd-GAL4; UAS-PH-GFP<sub>m20</sub>/+*. **D)** Ala silvestre. **E)** Ala *tub-GAL80<sup>ts</sup>/+; hh-GAL4/UAS-PH-GFP<sub>m20</sub>*. **F)** Halterio silvestre (ampliación de la foto D). **G)** Halterio mutante (ampliación de la foto E), nótese la presencia de tricomas caraterísticos de ala (flecha). **H)** Ampliación de la foto E mostrando una región posterior del ala que contiene cerdas con identidad anterior (flechas).

#### 4.1.3.3.- Los sobrecrecimientos de los discos imaginales producidos por la ganancia de PH están mediados por la hiperactivación de la vía JAK/STAT.

Para analizar los mecanismos por los que los altos niveles de la proteína PH estaban regulando la proliferación celular se estudiaron las vías de señalización que podrían estar implicadas en los sobrecrecimientos producidos por los altos niveles de PH. Una de las vías que controlan proliferación tanto en vertebrados como en *Drosophila* es la vía JAK/STAT (**Figura 8**) (revisado en (Arbouzova and Zeidler, 2006)). Se decidió, en primer lugar, investigar el papel de la vía JAK/STAT en el control de la proliferación mediada por las proteínas PcG.

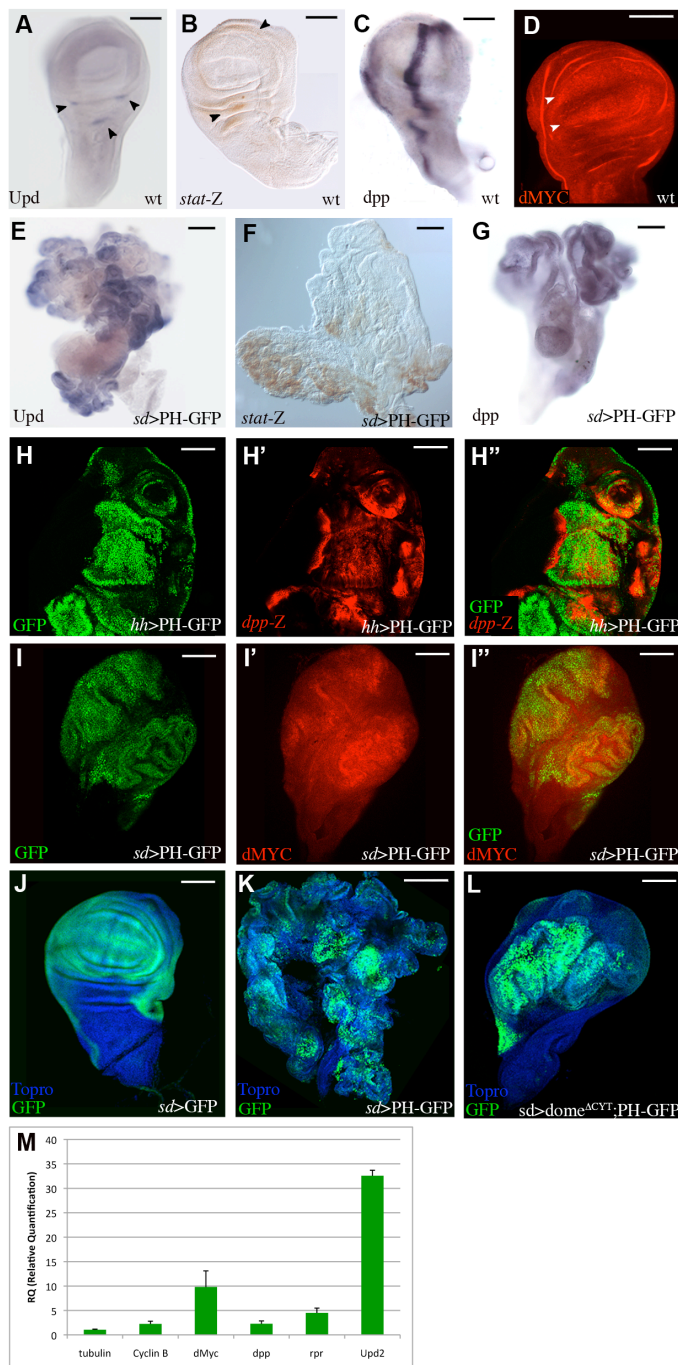
Para estudiar el efecto que la sobre-expresión de la proteína PH pudiera tener sobre la activación de la vía JAK/STAT, se analizó, en primer lugar, la expresión del ARNm de *upd*, el ligando de la vía, mediante análisis por hibridación *in situ* con una sonda de ARN

específica en discos de larvas *sd-GAL4/+; UAS-ph-EGFP<sub>m20</sub>/+*. Se observó que la expresión del ARNm de *upd* aumentaba fuertemente si se comparaba con la expresión en discos de larvas *sd-GAL4; UAS-GFP/+* (compárese **Figura 23A** con **23E**). También se cuantificó los niveles de expresión de *upd* por RT-PCR cuantitativa y como se puede observar en la **Figura 23M** los niveles de *upd* aumentan 32 veces comparado con la expresión que se detecta en los discos control. Estos resultados indican que altos niveles de expresión de PH promueven la activación de la expresión de *upd* y, por tanto, sugieren que los sobrecrecimientos observados pueden ser una consecuencia de la activación de la vía JAK/STAT.

Por otro lado, se analizó la expresión de *stat-lacZ* como gen reportero de la expresión de *stat92E* en discos imaginales de larvas *sd-GAL4/+; UAS-ph-EGFP<sub>m20</sub>/stat-lacZ* y se observó un aumento de la expresión de  $\beta$ gal (compárese **Figura 23B** con **23F**), seguramente como consecuencia de la activación de la vía a través de la activación de *upd*. Estos resultados indicaban que *upd* podría ser una diana directa de PH.

Para analizar el requerimiento funcional de la vía JAK/STAT en la producción de los sobrecrecimientos generados por los altos niveles de PH, se inactivó la vía usando el dominante negativo *UAS-dome<sup>ΔCYT</sup>*. Esta mutación en el receptor impide la activación de la vía por su ligando UPD (Brown et al., 2001). En primer lugar, se observó que las larvas *sd-GAL4/+; UAS-dome<sup>ΔCYT</sup>/+; UAS-ph-EGFP<sub>m20</sub>/+* presentaban menos retraso en el desarrollo y no eran tan grandes en comparación con las larvas *sd-GAL4/+; CyO, wg-lacZ/+; UAS-ph-EGFP<sub>m20</sub>/+*. Además, estas larvas alcanzaban con mayor frecuencia el estadio de pupa aunque no diferenciaban a adulto, sugiriendo ya un rescate del fenotipo. En segundo lugar, se analizaron los discos imaginales de ala de las larvas *sd-GAL4/+; UAS-dome<sup>ΔCYT</sup>/+; UAS-ph-EGFP<sub>m20</sub>/+* y se observó que el tamaño de estos discos era mucho menor que el tamaño de los discos *sd-GAL4/+; UAS-PH-GFP<sub>m20</sub>/+* (compárese **Figura 23K** con **23L**), y que la morfología del disco era más parecida a la de un disco silvestre (**Figura 23J**). Estos resultados indican que, al menos en parte, la activación de la vía JAK/STAT es responsable de la proliferación excesiva que tiene lugar en los discos imaginales en condiciones de sobre-expresión de PH.





**Figura 23.- La sobre-expresión de PH induce la activación de la vía JAK/STAT y de los factores WG, dMYC y DPP.** **A)** Disco imaginal de ala silvestre mostrando la expresión del ARNm de *Upd2* (cabezas de flecha). **B)** Disco imaginal de ala *stat-lacZ/+* mostrando expresión de *lacZ* (cabezas de flecha). **C)** Disco imaginal de ala silvestre mostrando la expresión del ARNm de *dpp*. **D)** Disco imaginal de ala silvestre mostrando la expresión de *dMYC* (rojo) (cabezas de flecha). **E)** Disco imaginal de ala *sd-GAL4/+; UAS-PH-GFP<sub>m20</sub>/+* mostrando expresión del ARNm de *Upd2*. Nótese la masiva proliferación del disco y la hiperactivación de la expresión de *Upd2*. **F)** Disco imaginal de ala *sd-GAL4/+; UAS-PH-GFP<sub>m20</sub>/stat-lacZ* mostrando expresión de *lacZ*. Nótese la hiperactivación de la expresión de *stat*. **G)** Disco imaginal de ala *sd-GAL4/+; UAS-PH-GFP<sub>m20</sub>/+* mostrando expresión del ARNm de *dpp*. **(H-H')** Discos imaginales de ala *tub-GAL80<sup>ts</sup>/dpp-lacZ; hh-GAL4/UAS-PH-GFP<sub>m20</sub>*. **H)** Expresión de *GFP* (verde). **H')** Expresión de *lacZ* (rojo). **H'')** Superposición de imágenes H y H'. **(I-I')** Discos imaginales de ala *sd-GAL4/+; UAS-PH-GFP<sub>m20</sub>/+*. **I)** Expresión de *GFP* (verde). **I')** Expresión de *dMYC* (rojo). **I'')** Superposición de imágenes I e I'. **J)** Disco imaginal de ala *sd-GAL4/+; UAS-GFP/+* mostrando expresión de *GFP* (verde) y *To-pro3* (azul). **K)** Disco imaginal de ala *sd-GAL4/+; UAS-PH-GFP<sub>m20</sub>/+* mostrando expresión de *GFP* (verde) y *To-pro3* (azul). **L)** Disco imaginal de ala *sd-GAL4/+; UAS-Dome<sup>ΔCT</sup>/+; UAS-PH-GFP<sub>m20</sub>/+* mostrando expresión de *GFP* (verde) y *To-pro3* (azul). Nótese la disminución de tamaño y de plegamientos en comparación con el disco mutante mostrado en K. **M)** Gráfico mostrando los resultados de la PCR cuantitativa en discos de alas *sd-GAL4/+; UAS-PH-GFP<sub>m20</sub>/+*.

Para determinar a que nivel de la vía JAK/STAT estaba actuando la proteína PH, se analizó la existencia de posibles PREs (Polycomb Response Elements) en la secuencia de los genes *outstreched* (*os*), *dómeles* (*dom*), *hopscotch* (*hop*) y *stat92E* mediante el uso de la base de datos disponible en la dirección web: <http://www.igh.cnrs.fr/equip/cavalli/link.PolycombTeaching.html> (Schuettengruber et al., 2009). Se encontró que el gen *outstreched*, que codifica para la proteína UPD (Figura 8), contenía un PRE en su secuencia. Se identificaron tres proteínas PcG que se unían a este PRE: PH, PHO (Pleiohomeotic) y PC (Polycomb) (Kwong et al., 2008; Oktaba et al., 2008; Schuettengruber et al., 2009; Schwartz et al., 2006). Por tanto, el gen *os* es,



probablemente, diana de las proteínas PcG. Por tanto, en condiciones normales de crecimiento, PH podría estar reprimiendo, a nivel transcripcional la expresión de los genes a través de su unión al PRE localizado en su secuencia, activándolo cuando los niveles de PH aumentan.

#### 4.1.3.4.- Efecto de la sobre-expresión de PH en la regulación de la ruta de señalización de DPP y del factor dMyc.

Puesto que DPP y dMYC son dos factores mitogénicos importantes para el desarrollo normal del ala de *Drosophila* y, además, estudios recientes los sitúan como supuestos genes diana de la vía JAK/STAT (Affolter and Basler, 2007; Eilers and Eisenman, 2008; Kiuchi et al., 1999; Lopez-Onieva et al., 2008; Wang et al., 2008), se decidió analizar su expresión en los discos imaginales de larvas *sd-GAL4/+; UAS-PH-GFP<sub>m20</sub>/+* para comprobar si su expresión estaba siendo afectada. Primero se estudió si la expresión de DPP estaba siendo activada en los sobrecrecimientos generados por altos niveles de PH. Para ello se hizo hibridación *in situ* con una sonda de ARN específica para *dpp* en discos imaginales de larvas *sd-GAL4/+; UAS-ph-EGFP<sub>m20</sub>/+* y se observó que la expresión del ARNm de *dpp* estaba aumentada en comparación con la expresión que mostraban los discos control *sd-GAL4; UAS-GFP/+* (**Figura 23G**). Además, se analizaron los niveles de expresión de *dpp* mediante RT-PCR cuantitativa también en discos *sd-GAL4/+; UAS-ph-EGFP<sub>m20</sub>/+* (**Figura 23J**) y se observó que se aumentaban 2.6 veces en comparación con los discos control. También se observó un aumento en los niveles de expresión del gen reportero *dpp-lacZ* en discos de larvas *tub-GAL80ts/dpp-lacZ; UAS-ph-EGFP/hh-GAL4* (**Figura 23H-H'**). Estos resultados indican que el gen *dpp* es activado en respuesta a altos niveles de PH. Sin embargo, esta activación podría estar ocurriendo a través de la activación de la vía JAK/STAT o bien a través de la regulación transcripcional directa por PH puesto que el gen *dpp* tiene un PRE en su región promotora. Cuando se analizó si la construcción *dpp-lacZ* tenía sitios de unión para la proteína STAT se encontraron 8 sitios putativos de unión para dicha proteína (**Anexo 1**), en cambio, no contenía ningún PRE en su secuencia. Así, estos resultados sugerían que la activación de la expresión de *dpp* en los sobrecrecimientos producidos por altos niveles de PH posiblemente eran mediados por la activación de la vía JAK/STAT y no directamente por PH.

En segundo lugar, se estudió la expresión de dMYC mediante tinción con anticuerpo anti-dMYC (**Figura 23I-I'**) y mediante RT-PCR cuantitativa (**Figura 23J**) en discos de larvas *sd-GAL4/+; UAS-ph-EGFP<sub>m20</sub>/+*. En ambos experimentos se observó un aumento en sus niveles de expresión, en el caso de la RT-PCR cuantitativa un aumento de 11.6 veces en comparación con el control. Por tanto, altos niveles de PH también activan la expresión de dMYC.

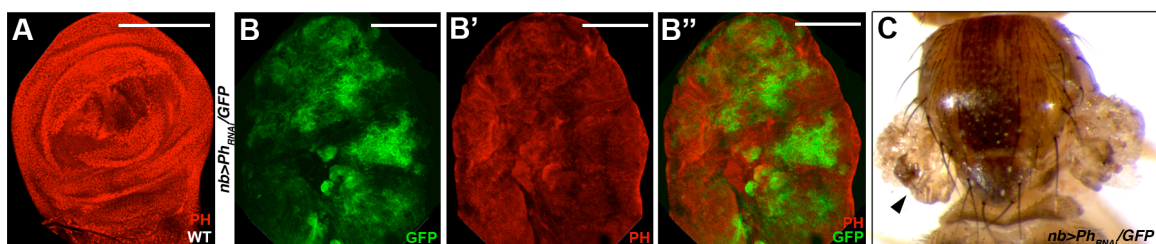
En conjunto, todos estos resultados indican que los sobrecrecimientos producidos por altos niveles de la proteína epigenética PH están mediados, en parte, por la activación de la vía JAK/STAT, a través de la posible regulación directa de *upd* por PH. Estos sobrecrecimientos también estarían mediados por la activación de DPP y dMYC, que a su vez podrían estar actuando como genes diana de la vía JAK/STAT, además de la activación de la vía de WG. Por otro lado, estos sobrecrecimientos dan lugar a tejidos diferenciados de carácter hiperplásico que presentan transformaciones homeóticas debidas a la desregulación del gen homeótico *Ubx*, tanto en el halterio como en el ala.

### 4.1.3.5.- Efecto de la inactivación del gen *ph* en el crecimiento de los discos imaginales:

Puesto que se había observado que tanto la falta como la ganancia de PH producía hiper-proliferación de los discos imaginales (Tabla 6), se decidió estudiar con más detalle el efecto de la falta de función de *ph* en el ala para analizar si los mecanismos por los cuales se estaban produciendo los sobrecrecimientos eran los mismos que en el caso de la sobre-expresión. En este caso, también se utilizó el sistema GAL4/UAS (Brand et al., 1994) para la inactivación de la expresión de *ph*.

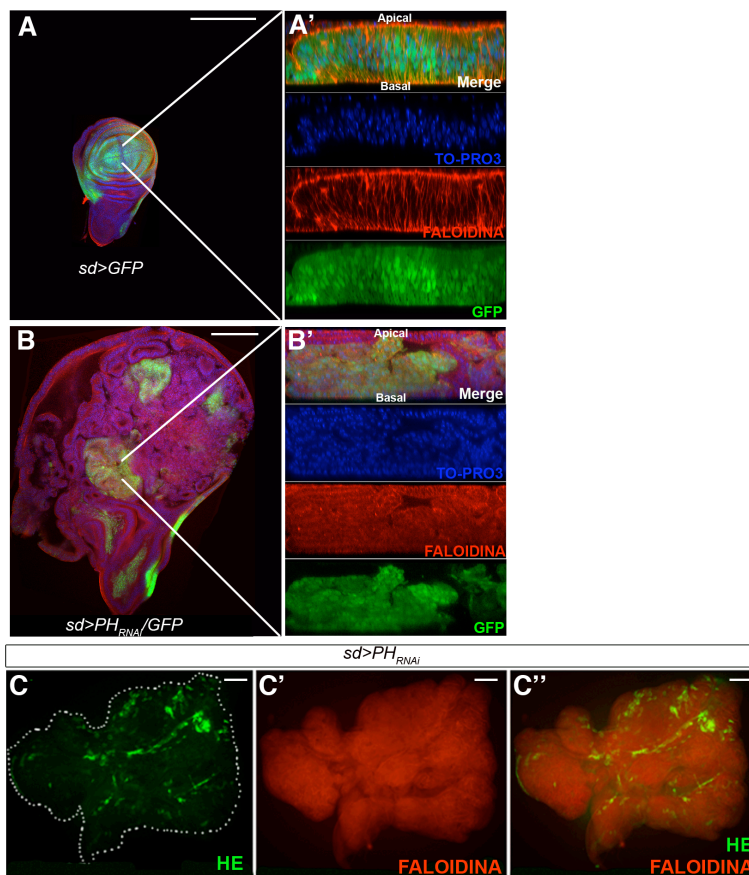
#### 4.1.3.4.1.- La inactivación de *ph* produce proliferación neoplásica en los discos imaginales de ala:

En primer lugar, y para comprobar la eficiencia de la construcción *UAS-ph<sup>RNAi</sup>*, se tiñeron los discos imaginales *nb-GAL4, UAS-GFP; UAS-ph<sup>RNAi</sup>/+* con el anticuerpo anti-PH y se observó que efectivamente se estaban reduciendo los niveles de su expresión (Figura 24A). Además, se observó que la inactivación de *ph* producía un efecto muy similar al de su sobre-expresión con respecto al retardo que se producía en el desarrollo de los individuos *nb-GAL4, UAS-GFP; UAS-ph<sup>RNAi</sup>/+* y a su letalidad. Para facilitar que algunos descendientes alcanzasen el estadio adulto, se crecieron las larvas *nb-GAL4, UAS-GFP; UAS-ph<sup>RNAi</sup>/+* a diferentes temperaturas para poder estudiar el fenotipo resultante, observándose una fuerte reducción del tamaño del ala, así como un cúmulo de células sin diferenciar, y transformaciones hacia *nótum* (Figura 24B y Tabla 6).



**Figura 24.- Efecto de la inactivación de *ph* en el ala.** A) Disco imaginal de ala silvestre mostrando expresión de PH (rojo). (B-B'') Discos imaginales de ala *nb-GAL4/+; UAS-ph<sup>RNAi</sup>/UAS-GFP*. B) Expresión de GFP (verde). B') Expresión de PH (rojo). B'') Superposición de imágenes B y B'. C) Mosca *nb-GAL4/+; UAS-ph<sup>RNAi</sup>/UAS-GFP*. Nótese la reducción en el tamaño del ala, a pesar de la masiva proliferación en los discos imaginales, y la presencia de tejido de notum duplicado (cabeza de flecha).

A continuación se analizó si los sobrecrecimientos producidos por la falta de *ph* eran hiperplásicos, como los producidos por los altos niveles de PH, o neoplásicos. Para analizar la integridad del epitelio de los discos en los que se inactivó *ph* se tiñeron discos imaginales de ala *sd-GAL4/+; UAS-ph<sup>RNAi</sup>/UAS-GFP* con el marcador celular de membrana Faloidina y con el marcador de núcleos To-pro 3. Como se observa en la **Figura 25**, el epitelio de los discos *sd-GAL4/+; UAS-ph<sup>RNAi</sup>/UAS-GFP* está desorganizado si se compara con el epitelio de un disco control *sd-GAL4/+; UAS-GFP*. Además, se hicieron tinciones con el anticuerpo anti-Hemese de discos *sd-GAL4/+; UAS-ph<sup>RNAi</sup>/+* y se observó que los bajos niveles de *ph* reclutaban hemocitos al tejido de ala sobrecrecido indicando que la integridad de la membrana basal estaba siendo comprometida (**Figura 25**). Estos resultados, junto con los observados anteriormente, permitieron concluir que bajos niveles de *ph* inducen sobrecrecimientos neoplásicos, en cambio, altos niveles de PH inducen sobrecrecimientos hiperplásicos.

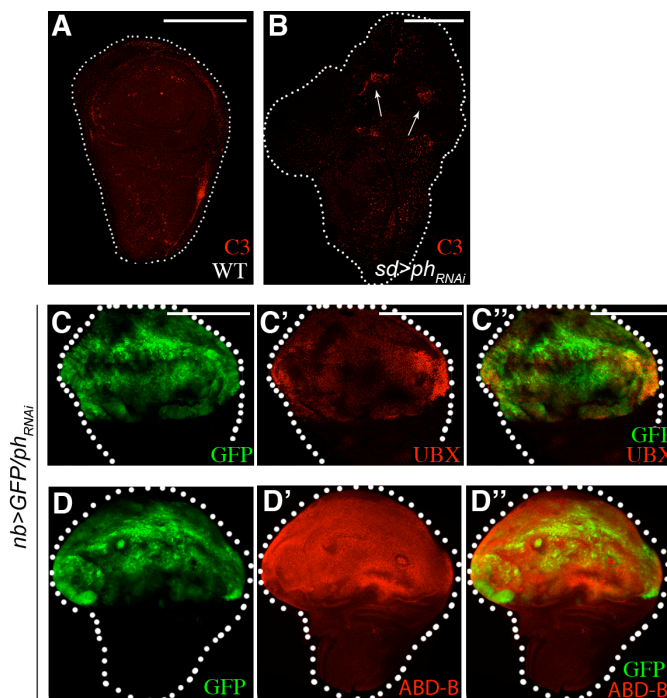


**Figura 25.- La inactivación de *ph* induce proliferación neoplásica.** **A)** Disco imaginal de ala *sd-GAL4/+; UAS-GFP/+* mostrando expresión de GFP (verde), Faloidina (rojo) y To-pro3 (azul). **A')** Corte ortogonal del disco *sd-GAL4/+; UAS-GFP/+*. **B)** Disco imaginal de ala *sd-GAL4/+; UAS-ph<sup>RNAi</sup>/UAS-GFP* mostrando expresión de GFP (verde), Faloidina (rojo) y To-pro3 (azul). Nótese la diferencia de tamaño en comparación con A debido a la hiperproliferación inducida por los bajos niveles de *ph*. **B')** Corte ortogonal del disco *sd-GAL4/+; UAS-ph<sup>RNAi</sup>/UAS-GFP*. Nótese como se ha perdido la morfología del epitelio en comparación con A'. **(C-C'')** Discos imaginales de ala *sd-GAL4/+; UAS-ph<sup>RNAi</sup>/+*. **C)** Expresión de hemese (verde). Nótese el elevado número de hemocitos. **C')** Expresión de faloidina (rojo), que marca membrana celular. **C'')** Superposición de imágenes C y C'.

## 4.1.3.4.1.- La inactivación de *ph* produce una débil inducción de apoptosis y una fuerte des-represión de las proteínas homeóticas UBX y ABD-B en los discos imaginales de ala.

Se analizó la expresión de C3 en discos *sd-GAL4/+; UAS-ph<sup>RNAi</sup>/+* y se observó, aunque muy débilmente, la inducción de apoptosis (**Figura 26B**), lo que contrasta con los

altos niveles de apoptosis observados cuando se sobre-expresa la proteína PH en los discos imaginales (Tabla 6 y Figura 21). Por otro lado, como en los individuos adultos era difícil analizar la presencia de transformaciones homeóticas, se analizó la expresión de UBX y ABD-B en las células de los discos imaginales de larvas *nb-GAL4, UAS-GFP/+; UAS-phRNAi/+* y se observó que se inducía una fuerte des-represión tanto de la proteína UBX como de ABD-B (Figura 26C-D'' y Tabla 6), si bien no se observó UBX en todas las células del dominio de expresión de *nb-GAL4* probablemente debido a su represión por ABD-B (Figura 26C'). A pesar de la fuerte des-represión de estas dos proteínas homeóticas en los discos imaginales, éstos presentaban grandes sobrecrecimientos (compárese Figura 13C con A).



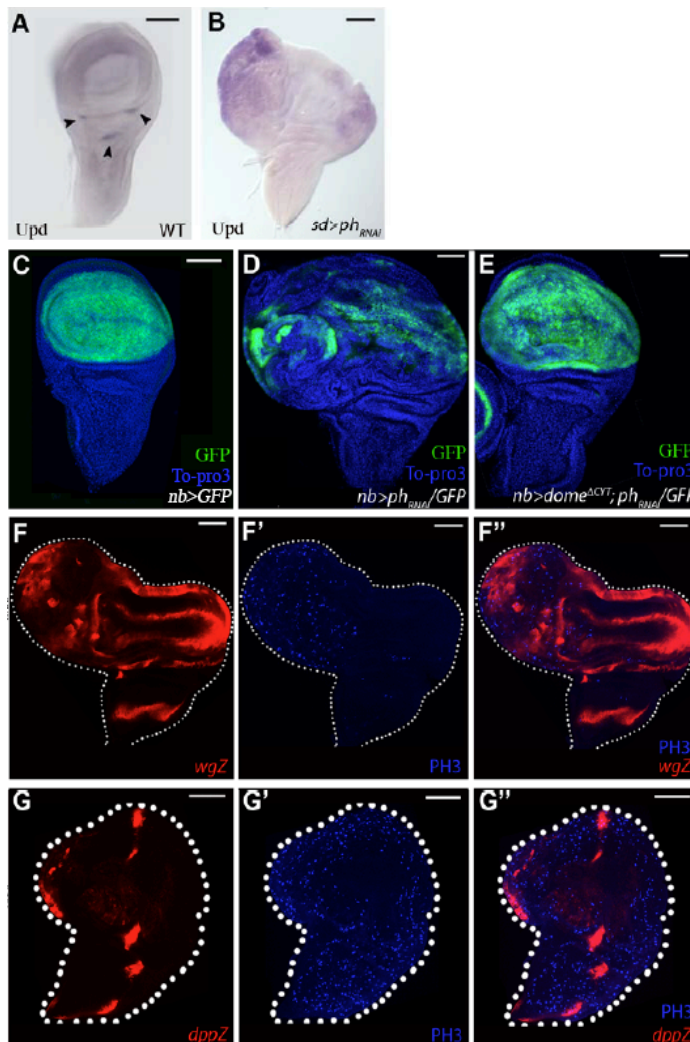
**Figura 26.- Efectos de la inactivación de *ph* en la apoptosis y en la expresión de las proteínas homeóticas UBX y ABD-B.** A) Disco imaginal de ala silvestre mostrando expresión de caspasa-3 activada (C3) (rojo). B) Disco imaginal de ala *sd-GAL4/+; UAS-phRNAi/+* mostrando expresión de C3 (rojo) (flechas). (C-D'') Discos imaginales de ala *nb-GAL4, UAS-GFP/+; UAS-phRNAi/+*. C) Expresión de GFP (verde), indicativo del dominio de expresión de *nubbin*. C') Expresión de UBX (rojo). C'') Superposición de imágenes C y C'. D) Expresión de GFP (verde), indicativo del dominio de expresión de *nubbin*. D') Expresión de ABD-B (rojo). D'') Superposición de imágenes D y D'.

## ○ La inactivación de *ph* produce la activación de la vía JAK/STAT y de los mitógenos DPP y WG:

Debido a la existencia de un PRE en el gen *upd*, y debido a que altos niveles de expresión de PH producían una hiper-activación de la vía JAK/STAT, se analizó si en condiciones de inactivación de *ph* la activación de la vía JAK/STAT también estaba afectada. Para ello se analizó la expresión del ARNm de *upd* mediante hibridación in situ con sonda *upd* en discos de larvas *sd-GAL4/+; UAS-phRNAi/+* y se observó que la expresión del ARNm de *upd* aumentaba fuertemente si se comparaba con la expresión de un disco control *sd-GAL4/+; UAS-GFP/+* (compárese Figura 27A con B), indicando que la inactivación de *ph* también producía una hiper-activación de la vía JAK/STAT. A continuación, para analizar si la vía JAK/STAT era funcionalmente requerida para los sobrecrecimientos producidos por la inactivación de *ph*, se inactivó la vía usando el dominante negativo *UAS-dome<sup>AcvT</sup>*. Se observó que las larvas *nb-GAL4, UAS GFP/UAS-*



*dome*<sup>ΔCYT</sup>; *UAS-phRNAi*/+ presentaban menos retraso en el desarrollo y no eran tan grandes en comparación con las larvas *nb-GAL4*, *UAS-GFP*/+; *UAS-phRNAi*/+, lo que sugería que estaba habiendo un rescate de los sobrecrecimientos. También se analizaron los discos imaginales de ala de las larvas *nb-GAL4*, *UAS-GFP*/*UAS-dome*<sup>ΔCYT</sup>; *UAS-phRNAi*/+ y se observó que, aunque había crecimiento, el tamaño de los discos era mucho menor que el tamaño de los discos *nb-GAL4*, *UAS-GFP*/+; *UAS-phRNAi*/+ (compárese **Figura 27E** con **D**), y que la morfología del disco era más parecida a la de un disco silvestre. Estos resultados indicaban que, al menos en parte, la activación de la vía JAK/STAT era responsable de la proliferación excesiva que estaba teniendo lugar en los discos imaginales en condiciones de inactivación de *ph*.



**Figura 27.- La inactivación de *ph* induce la activación de la vía JAK/STAT y de los factores WG y DPP.** **A)** Disco imaginal de ala silvestre mostrando la expresión del ARNm de *Upd2* (cabezas de flecha). **B)** Disco imaginal de ala *sd-GAL4*/+; *UAS-phRNAi*/+ mostrando expresión del ARNm de *Upd2*. **C)** Disco imaginal de ala *nb-GAL4*/+; *UAS-GFP*/+ mostrando expresión de GFP (verde), indicativo del dominio de expresión de nubbin, y To-pro-3 (azul). **D)** Disco imaginal de ala *nb-GAL4*/+; *UAS-phRNAi*/*UAS-GFP* mostrando expresión de GFP (verde) y To-pro-3 (azul). **E)** Disco imaginal de ala *nb-GAL4*/+; *UAS-Dome*<sup>ΔCYT</sup>/+; *UAS-phRNAi*/*UAS-GFP* mostrando expresión de GFP (verde) y To-pro-3 (azul). Nótese la disminución de tamaño en comparación con el disco mutante mostrado en **D**. **(F-F'')** Discos imaginales *nb-GAL4*/*wg-lacZ*; *UAS-phRNAi*/+. **F)** Expresión de *lacZ* (rojo). **F')** Expresión de fosfo-histona-3 (PH3) (azul). **F'')** Superposición de imágenes **F** y **F'**. **(G-G'')** Discos imaginales *nb-GAL4*/+; *UAS-phRNAi*/*dpp-lacZ*. **G)** Expresión de *lacZ* (rojo). **G')** Expresión de PH3 (azul). **G'')** Superposición de imágenes **G** y **G'**.

Además, se estudió la expresión de WG y DPP mediante el uso de las construcciones *wg-lacZ* y *dpp-lacZ* en discos *nb-GAL4*/*wg-lacZ*; *UAS-phRNAi*/+ y *nb-GAL4*/*dpp-lacZ*; *UAS-phRNAi*/+, respectivamente, y se observó que la inactivación de *ph* inducía la expresión ectópica tanto de *wg-lacZ* como de *dpp-lacZ* (**Figura 27F-G''**), indicando que en los sobrecrecimientos producidos por la falta de *ph* también estaban implicadas las vías de

WG y DPP.

Todos estos resultados, tomados en su conjunto, indican que los sobrecrecimientos producidos por la alteración de los niveles de la proteína PH están mediados por la activación de la expresión de WG y por la activación de la vía JAK/STAT que directa o indirectamente produce la activación de DPP y dMYC, como genes diana de dicha vía. Por otro lado, estos sobrecrecimientos dan lugar, en el caso de altos niveles de PH, a tejidos diferenciados de carácter hiperplásico, y en el caso de bajos niveles de PH, a tejidos desdiferenciados de carácter neoplásico. Además, el efecto sobre la expresión de las proteínas homeóticas es diferente, observándose una débil des-represión de UBX en discos imaginales donde se ha sobre-expresado PH y, en cambio, una fuerte des-represión de UBX y ABD-B en discos imaginales donde la función de *ph* ha sido inactivada.

### 4.2.- ESTUDIO DEL PAPEL DE LA PROTEÍNA DP53 EN EL CONTROL DE LA APOPTOSIS Y DE LA PROLIFERACION CELULAR EN EL ALA DE *Drosophila*.

A pesar de todos los estudios realizados en mamíferos y del conocimiento acumulado sobre la función de P53, poco se sabe sobre su función en *Drosophila*. La estructura de la proteína P53 está conservada en la evolución y, en *Drosophila*, codifica para al menos 2 isoformas proteicas: Dp53 (proteína completa) y DΔNp53 (proteína truncada en el dominio N-terminal) (Dichtel-Danjoy et al., 2013; Marcel et al., 2011). La isoforma DΔNp53 fue la primera isoforma proteica de P53 identificada en *Drosophila*. Además, esta isoforma es la principal reguladora de la apoptosis, a través de la activación del gen pro-apoptótico *rpr* (Brodsky et al., 2000; Dichtel-Danjoy et al., 2013).

#### 4.2.1. - *Dp53* interacciona genéticamente con *Notch* y *wingless*.

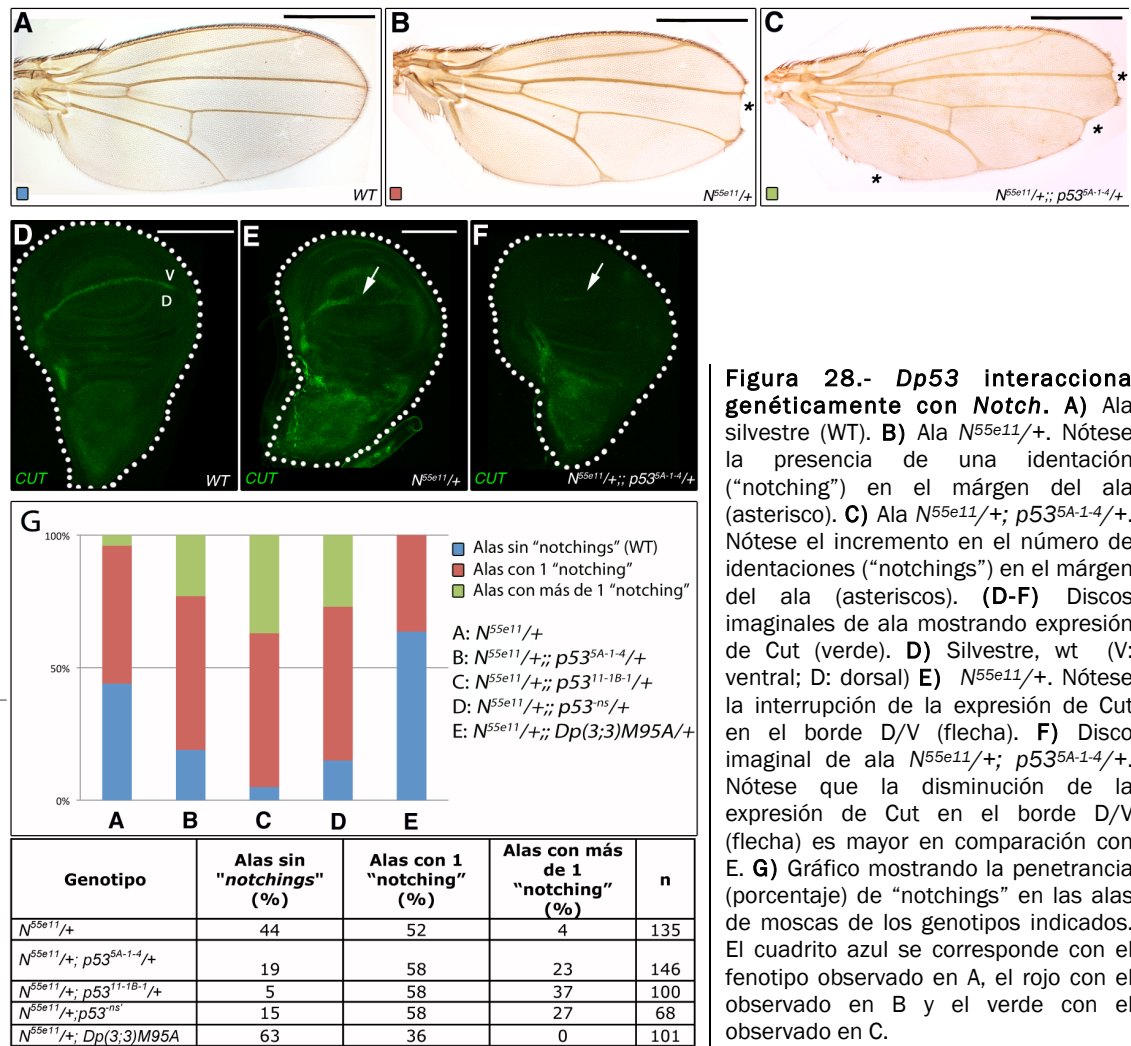
Para estudiar la función de Dp53 en el control de la expresión génica en *Drosophila*, se llevó a cabo en el laboratorio una búsqueda de genes que interaccionasen genéticamente con el gen *Dp53* y que estuviesen involucrados en los procesos de proliferación y apoptosis. Entre ellos se encontró a los genes *Notch* (*N*) y *wingless* (*wg*).

Al igual que en mamíferos, la falta de *Dp53* en la mosca no produce ningún fenotipo (Brodsky et al., 2004; Lee et al., 2003) (**Figura 28A**), lo que sugiere que *Dp53* no es esencial para el desarrollo normal de los individuos. Sin embargo, las moscas mutantes homocigóticas para *Dp53* presentan una reducida viabilidad y son más sensibles a la irradiación en comparación con moscas silvestres (Lee et al., 2003). Por otro lado, la falta del gen *Notch* es letal en homocigosis. Pero hembras que contienen mutaciones de *Notch* en heterocigosis son viables y fértiles, si bien muestran un fenotipo visible en las alas, que consiste en la presencia de indentaciones o “*notchings*” en el margen del ala,

frecuentemente localizados entre las venas 3 y 4, y ensachamiento de las venas 3 y 5. Estos fenotipos son variables en penetrancia y expresividad (Mohr, 1919) (**Figura 28B y G**).

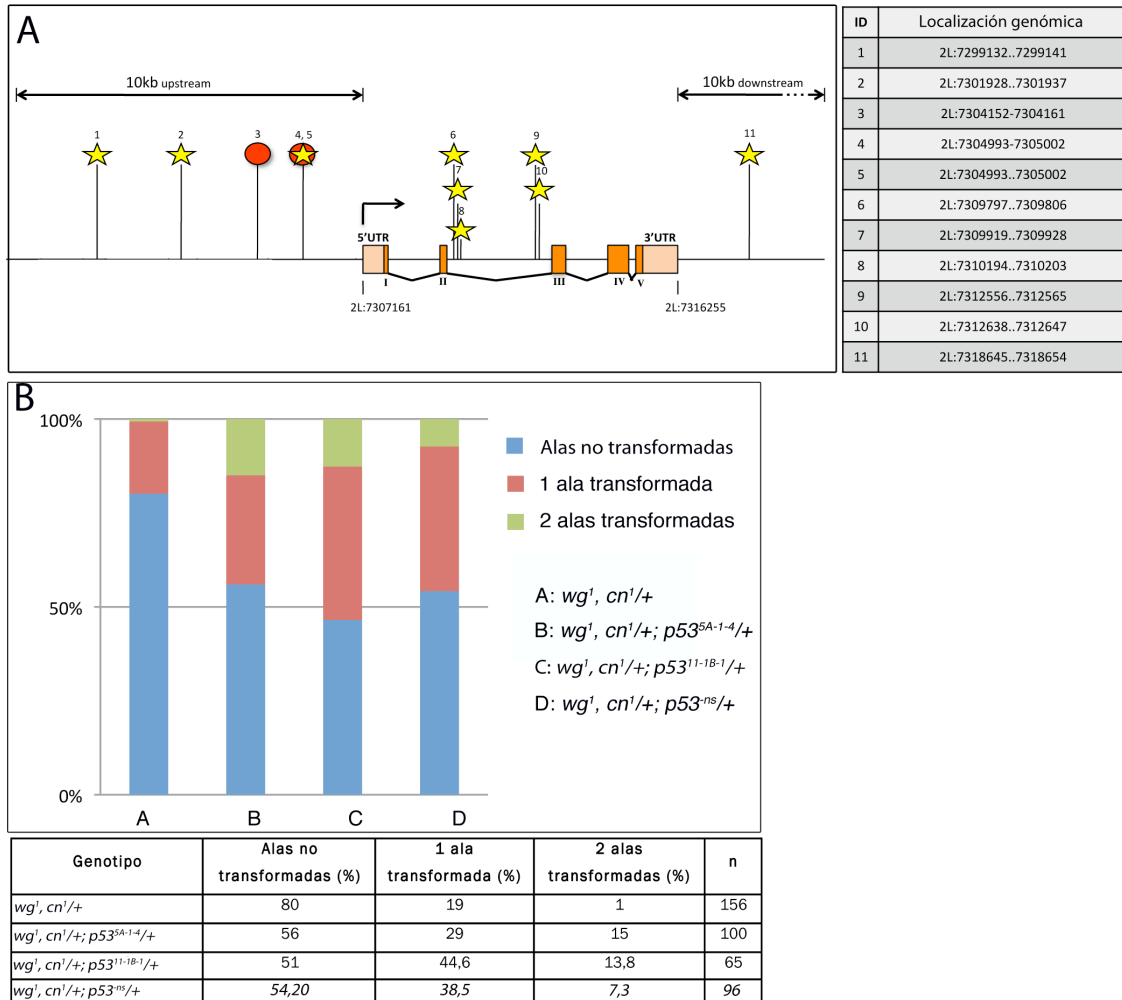
Para estudiar la interacción genética entre *Dp53* y *Notch* se utilizaron los siguientes alelos mutantes: *N<sup>55e11</sup>*, *p53<sup>5A-1-4</sup>*, *p53<sup>11-1B-1</sup>* y *p53<sup>ns</sup>* (ver materiales y métodos). Las hembras *N<sup>55e11</sup>/+* muestran generalmente un “*notching*” en el margen del ala entre las venas 3 y 4, con una penetrancia del 52% (**Figura 28B y G**). Tan solo el 4% de las alas de moscas *N<sup>55e11</sup>/+* presentan más de un “*notching*” en el margen del ala. Como se observa en la **Figura 28C y 28G**, la falta de función de *Dp53* aumenta el fenotipo de falta de función de *Notch*, aumentando tanto su penetrancia como su expresividad. Así, las alas de hembras *N<sup>55e11</sup>/+; p53<sup>5A-1-4</sup>/+* presentan un “*notching*” con una penetrancia del 58% (**Figura 28G**) y más de un “*notching*” con una penetrancia del 23% (**Figura 28C y G**) comparado con un 4% en moscas *N<sup>55e11</sup>/+*. Resultados similares se observaron en moscas *N<sup>55e11</sup>/+; p53<sup>11-1B-1</sup>/+* y *N<sup>55e11</sup>/+; p53<sup>ns</sup>/+*, con una penetrancia en el fenotipo de las alas con más de un “*notching*” del 37% y 27%, respectivamente (**Figura 28G**), sugiriendo una interacción genética. Para comprobar que este aumento en la penetrancia y expresividad del fenotipo estaba siendo debido únicamente a la falta de *Dp53* se realizó un experimento de rescate con una duplicación genómica de *Dp53*, y como se observa en la **Figura 28G**, sólo el 36% de las hembras *N<sup>55e11</sup>/+; Dp(3;3)M95A+13/+* presentaron un “*notching*” en las alas, y ninguna mosca presentó alas con más de un “*notching*”, indicando, por tanto, que *Dp53* es el responsable del efecto observado.

Para estudiar si esta interacción tenía algún efecto en la actividad de *Notch*, se analizó la expresión de la proteína CUT, que se activa en el borde D/V a través de la activación de *Notch* (Micchelli et al., 1997), en discos imaginales de ala *N<sup>55e11</sup>/+* comparándola con la de discos *N<sup>55e11</sup>/+; p53<sup>5A-1-4</sup>/+*. Se observó que la expresión de CUT estaba reprimida en los discos *N<sup>55e11</sup>/+; p53<sup>5A-1-4</sup>/+* (**Figura 28 D-F**). En conjunto, estos resultados indican que el gen *Dp53* interacciona genéticamente con el gen *Notch*, sugiriendo que *Dp53* podría controlar la expresión de *Notch* a nivel transcripcional.



Para estudiar la interacción genética entre *Dp53* y *wg* se utilizaron los mismos alelos mutantes de *Dp53*:  $p53^{5A-1-4}$ ,  $p53^{11-1B-1}$  y  $p53^{ns}$ . La mutación del gen *wg* elegida fue:  $wg^1$ , que es un alelo hipomorfo, viable, que produce transformación de ala a nótum (Couso and Martinez Arias, 1994). Por tanto, se estudió, en un fondo mutante tanto para *Dp53* como para *wg*, la frecuencia de aparición del fenotipo de transformación de ala a *notum*. Como se observa en la **Figura 29B**, la falta del gen *Dp53* en heterocigosis aumenta la frecuencia de aparición de transformaciones ala-*notum*. Estos resultados indican que el gen *Dp53* interacciona genéticamente con el gen *wg*, sugiriendo que *Dp53* podría controlar la expresión de *wg* a nivel transcripcional. Esta hipótesis se ve apoyada por el hecho de que se predijeron bioinformáticamente 10 sitios putativos de unión para *Dp53* en la secuencia del gen *wg* (**Figura 29A**). En el laboratorio se está trabajando en esta hipótesis. En lo sucesivo se hace referencia de forma más concreta al análisis realizado en este trabajo de Tesis que estudia la interacción de *Dp53* con el gen *Notch*.

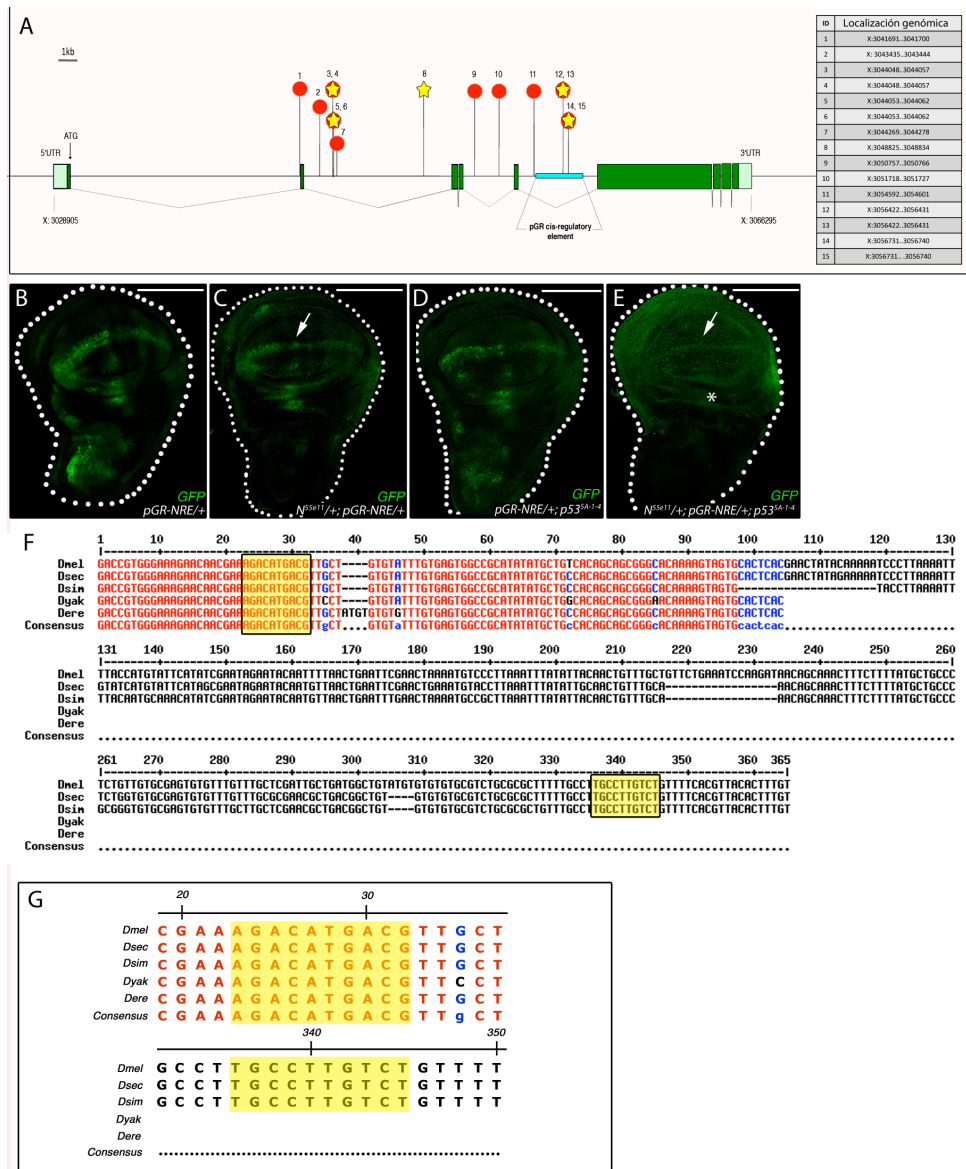




**Figura 29.- Dp53 interacciona genéticamente con wg.** **A)** Representación esquemática del locus del gen *wg* mostrando los sitios de unión predichos para Dp53 (izquierda) y la localización genómica de cada uno de ellos (tabla derecha). La localización de las secuencias en el genoma fue tomada de *flybase* (versión FB2013\_03). Las estrellas indican los sitios de unión de Dp53 predichos mediante el uso de la matriz V\$P53\_02 y los círculos rojos los predichos mediante el uso de la matriz V\$P53\_DECAMER\_Q2 (ver materiales y métodos). Los sitios que fueron predichos por las 2 matrices se tratan como un solo sitio de unión (p.e. el sitio 4-5). **B)** Gráfico mostrando la penetrancia (porcentajes) del fenotipo de transformación ala-*notum* en moscas de los genotipos indicados. En la tabla se muestran los porcentajes y el número de moscas analizadas en cada caso (n).

#### 4.2.2. - Dp53 regula transcripcionalmente la expresión de *Notch*.

Para estudiar si DP53 estaba regulando transcripcionalmente la expresión del gen *Notch*, se analizó bioinformáticamente su región genómica en búsqueda de posibles sitios de unión para el factor de transcripción Dp53. El análisis bioinformático de la región genómica del gen *N* reveló la existencia de 11 sitios putativos de unión para Dp53 en su secuencia (**Figura 30A**). A continuación, se analizó el grado de conservación de estos sitios de unión de Dp53 en el gen *Notch* entre distintas especies de *Drosophila* y se comprobó que los sitios más conservados eran los localizados en la región intrónica comprendida entre los exones IV y V del gen *Notch* (**Figura 30F y G**).



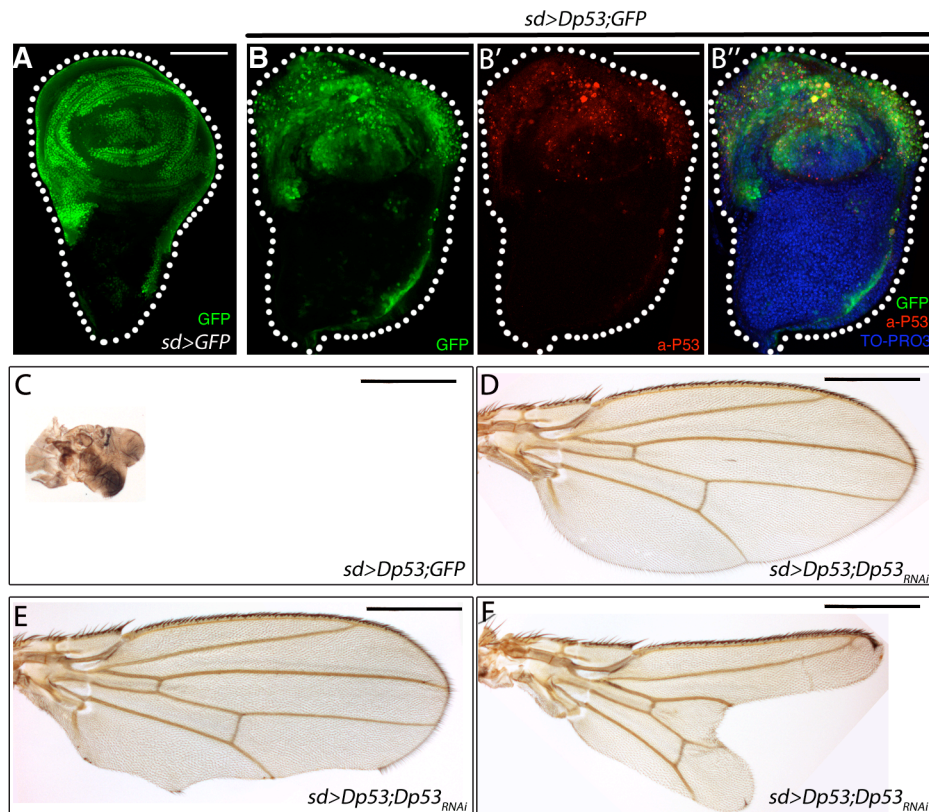
**Figura 30.- Dp53 regula transcripcionalmente la expresión de Notch.** **A)** Representación esquemática del locus del gen *Notch* mostrando los sitios de unión predichos para Dp53 (izquierda) y la localización genómica de cada uno de ellos (tabla derecha). La localización de las secuencias en el genoma fue tomada de *flybase* (versión FB2013\_03). Las estrellas indican los sitios de unión de Dp53 predichos mediante el uso de la matriz V\$P53\_02 y los círculos rojos los predichos mediante el uso de la matriz V\$P53\_DECAMER\_Q2 (ver materiales y métodos). Los sitios que fueron predichos por las 2 matrices se tratan como un solo sitio de unión (p.e. el sitio 12-13). El rectángulo azul claro representa la localización de la construcción *pGR-NRE* que mapea genómicamente con 2 de los sitios predichos para Dp53 (el 12-13 y el 14-15). **(B-E)** Discos imaginales de ala *pGR-NRE/+* en distintas combinaciones genéticas mostrando la expresión de GFP (verde) indicativo de la actividad del enhancer *NRE*. **B)** Disco *pGR-NRE/+*. **C)** Disco *N55e11/+; pGR-NRE/+*. Nótese una ligera disminución de la expresión de GFP en el borde D/V (flecha). **D)** Disco *pGR-NRE/+; p53<sup>A-1-4</sup>/+*. **E)** Disco *N55e11/+; pGR-NRE/+; p53<sup>A-1-4</sup>/+*. Nótese una mayor disminución de la expresión de GFP en el borde D/V (flecha), incluso en el *hinge* (asterisco), en comparación con C. **F)** Conservación de los sitios de unión de Dp53 12-13 y 14-15 (rectángulos amarillos) en distintas especies de *Drosophila*. **G)** Ampliación de F.

Para estudiar si los sitios de unión de DP53 a *N* eran funcionales, se utilizó la construcción *pGR-NRE* (*pGreen* *Rabbit- Notch Response Element*) (cedida por la Dra. S. Bray), conteniendo una secuencia cis-reguladora del intrón V del gen *Notch* y la proteína GFP como reportera de la expresión (Housden et al., 2012). Además, esta construcción

contiene 2 sitios putativos de unión para Dp53 (**Figura 30A y 30F-G**). La expresión de GFP en discos de larvas control *pGR-NRE/+* se localiza en la región presuntiva de ala o “wing pouch”, siendo más fuerte en la zona del borde D/V, ya que responde a los altos niveles de actividad de Notch (Housden et al., 2012). Además, muestra expresión en las células del “hinge” y en el “notum” (**Figura 30B**). Se comparó la expresión de GFP en discos imaginales de ala control *pGR-NRE/+* con la de discos *N<sup>55e11</sup>/+; pGR-NRE/+*, discos *pGR-NRE/+; p53<sup>5A-1-4</sup>/+* y discos *N<sup>55e11</sup>/+; pGR-NRE/+; p53<sup>5A-1-4</sup>/+* (**Figura 30B-E**). Para minimizar los efectos de variación de la expresión del reportero GFP durante el desarrollo de los discos imaginales, las larvas mutantes y control se crecieron en tubos conteniendo papilla azul (ver materiales y métodos) para poder seleccionar las que estuviesen en el mismo estadio larvario y poder diseccionar discos imaginales de ala en el mismo momento del desarrollo. No se encontró variación de la expresión de GFP en discos *pGR-NRE/+; p53<sup>5A-1-4</sup>/+* respecto a la expresión de GFP en discos *pGR-NRE/+* (compárese **Figura 30B** con **30D**). En cambio, en los discos *N<sup>55e11</sup>/+; pGR-NRE/+* si se observó una ligera disminución de la expresión de GFP en el borde dorso-ventral (compárese **Figura 30B** con **30C**), como era de esperar, ya que la construcción *pGR-NRE* contiene un elemento de respuesta a *Notch* (datos no publicados). Esta disminución de la expresión de GFP fue mucho más evidente en discos *N<sup>55e11</sup>/+; pGR-NRE/+; p53<sup>5A-1-4</sup>/+*, observándose no sólo reducidos niveles de expresión en el borde D/V sino también de forma general en el “wing pouch”, “hinge” y “notum” (**Figura 30E**). Estos resultados indican que *Dp53* regula *in vivo* los niveles de expresión de *Notch* a nivel transcripcional.

#### 4.2.3. – Altos niveles de Dp53 inducen la expresión de Notch y de WG

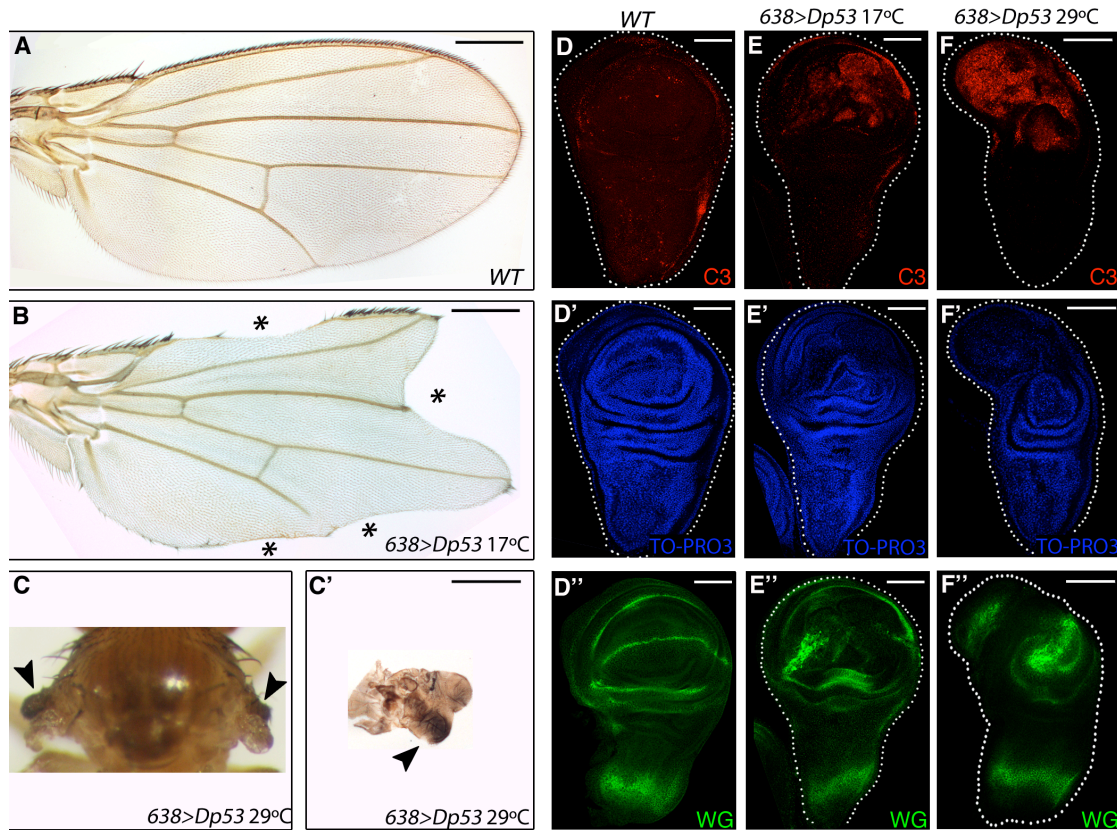
Se sobre-expresó la proteína Dp53 (isoforma DΔNp53, (Dichtel-Danjoy et al., 2013)) usando el sistema GAL4/UAS (Brand et al., 1994). Para confirmar que efectivamente se estaban aumentando los niveles de la proteína Dp53 se tiñeron discos imaginales de larvas *sd-GAL4/+; UAS-Dp53/+; UAS-GFP/+* con diferentes anticuerpos anti-P53 (*Hybridoma Bank*) (**Figura 31B-B''**). Además, el fenotipo de la sobre-expresión de Dp53 (**Figura 31C**) era rescatado, con pequeñas variaciones en la expresividad, por su falta de función (**Figura 31D-F**). En el **Anexo 2** se muestra un resumen de todos los fenotipos obtenidos al sobre-expresar Dp53 con diferentes líneas GAL4 y a distintas temperaturas.



**Figura 31.- El fenotipo de sobre-expresión de Dp53 es rescatado por su falta de función.** **A)** Disco imaginal de ala *sd-GAL4/+; UAS-GFP/+* mostrando expresión de GFP (verde). **(B-B'')** Discos imaginales de ala *sd-GAL4/+; UAS-Dp53/UAS-GFP*. **B)** Expresión de GFP (verde). **B')** Expresión de Dp53 (rojo). **B'')** Superposición de imágenes B y B'. **C)** Ala *sd-GAL4/+; UAS-Dp53/UAS-GFP*. **(D-F)** Alas *sd-GAL4/+; UAS-Dp53/UAS-Dp53<sup>RNAi</sup>*. Nótese la variabilidad en la expresividad del fenotipo que refleja la variabilidad del rescate, desde rescate total (D), casi total (E), e intermedio (F).

Los discos imaginales de larvas *638-GAL4/+; UAS-Dp53/+* presentaban, como ha sido previamente descrito (Brodsky et al., 2000; Brodsky et al., 2004; Dichtel-Danjoy et al., 2013; Fan et al., 2010; Jin et al., 2000; Ollmann et al., 2000), revisado en (Marcel et al., 2011)), fuerte inducción de la apoptosis y además alto grado de proliferación, que ha sido descrita como la proliferación que induce Dp53 en respuesta a la apoptosis (**Figura 32**). Estudios previos, también han descrito que esta proliferación podría ser debida a la inducción de la expresión de WG y DPP, dos factores mitogénicos que podrían ser los responsables de la inducción de proliferación en respuesta a la apoptosis (Wells and Johnston, 2012). Efectivamente, se observó que en discos de ala *638-GAL4/+; UAS-Dp53/+* la expresión de WG estaba aumentada (**Figura 32E''-F''**), sugiriendo de nuevo que Dp53 podría estar activando a *wg* transcripcionalmente y, como consecuencia, se ve un aumento en la expresión de la proteína. Además, la inactivación de *wg* rescatava parcialmente el fenotipo de sobre-expresión de Dp53 (**Figura 33**), indicando que Wingless es uno de los factores responsables de la proliferación inducida por los altos niveles de Dp53, de acuerdo a resultados previos (Dichtel-Danjoy et al., 2013).

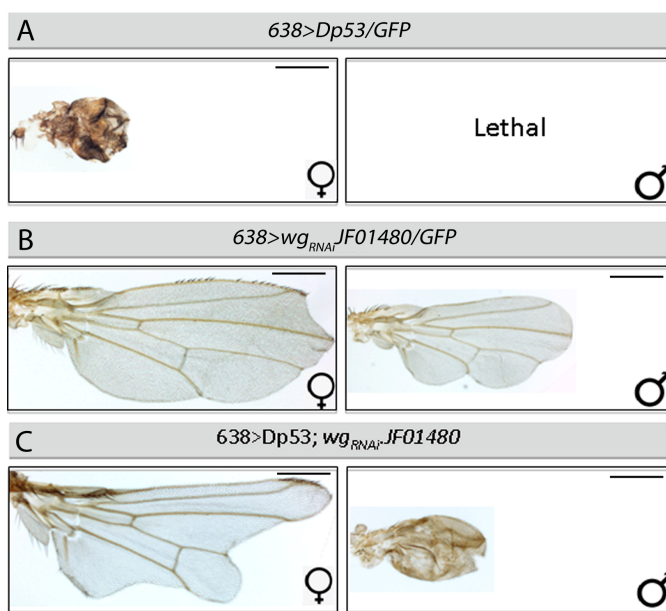




**Figura 32.- Efecto de la sobre-expresión de Dp53 en el ala.** A) Ala silvestre. (B-C') Alas 638-GAL4/+; UAS-Dp53/+ de moscas desarrolladas a 17°C (B) o 29°C (C-C'). Nótese la presencia de “notchings” en el margen del ala (asteriscos) en imagen B y la presencia de tejido de notum duplicado (cabezas de flecha) en imágenes C y C'. C') Ampliación de C. (D-D') Discos imaginales de ala silvestres (WT) D) Expresión de caspasa-3 activada (C3) (rojo). D') Expresión de To-pro-3 (azul). D'') Expresión de Wingless (WG) (verde). (E-E'') Discos imaginales de ala de larvas 638-GAL4/+; UAS-Dp53/+ desarrolladas a 17°C. E) Expresión de caspasa-3 activada (C3) (rojo). E') Expresión de To-pro-3 (azul). E'') Expresión de Wingless (WG) (verde). (F-F'') Discos imaginales de ala de larvas 638-GAL4/+; UAS-Dp53/+ desarrolladas a 29°C. F) Expresión de caspasa-3 activada (C3) (rojo). F') Expresión de To-pro-3 (azul). F'') Expresión de Wingless (WG) (verde).

Por otro lado, debido a que los altos niveles de Notch inducen proliferación celular (Baonza and Garcia-Bellido, 1999; Djiane et al., 2013; Giraldez and Cohen, 2003; Go et al., 1998), y debido a que nuestros resultados indican que Dp53 activa transcripcionalmente la expresión de *Notch*, se estudió si la sobre-expresión de Dp53 era capaz de activar también la expresión de *Notch* en discos imaginales de ala 638-GAL4/+; UAS-Dp53/+, que se detectó mediante tinción con anticuerpo anti-Notch (*Hybridoma Bank*). Como se observa en la **Figura 34C**, altos niveles de Dp53 activan la expresión de Notch en las células del ala que están proliferando. Para comprobar que no sólo la expresión de Notch estaba siendo aumentada sino también la actividad de Notch, se tiñeron los discos imaginales 638-GAL4/+; UAS-Dp53/+ con anticuerpo anti-Notch-intra (*Hybridoma Bank*), que reconoce específicamente el dominio intracelular del receptor de Notch y que se corresponde con la forma activa del mismo. En la **Figura 34E-E'** puede observarse la expresión ectópica de Notch-intra debida a la sobre-expresión de DP53. También se analizó la expresión de CUT, que es un gen diana de la vía de Notch (Micchelli et al., 1997) y que,

según se ha descrito, su expresión se activa de manera ectópica fuera del borde dorso/ventral debido a la activación de la vía de Notch (Baonza and Garcia-Bellido, 2000), en discos 638-GAL4/+; UAS-Dp53/+, observándose una muy débil activación ectópica de CUT en los crecimientos del “wing pouch” (Figura 34G-G’), indicativo de la activación de la vía de Notch.



**Figura 33.- El fenotipo de sobre-expresión de Dp53 es parcialmente rescatado por la inactivación de wg.** A) Alas 638-GAL4/+; UAS-DP53/UAS-GFP. B) Alas 638-GAL4/+; UAS-WG<sup>RNAi</sup>JF01480/UAS-GFP. C) Alas 638-GAL4/+; UAS-DP53/+; UAS-WG<sup>RNAi</sup>JF01480/+. Todas las moscas se dejaron desarrollar a 25°C.

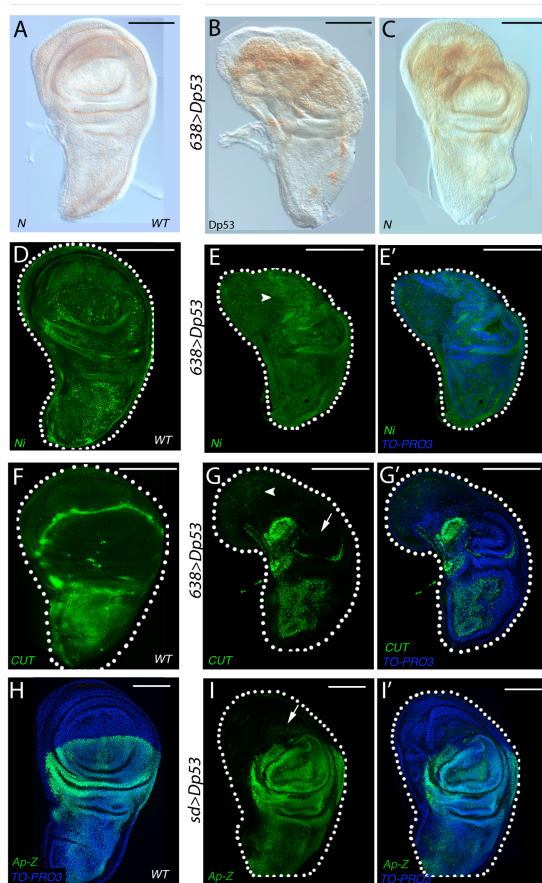
En conjunto, estos resultados indican que la vía de Notch está siendo activada, fuera del borde D/V, en condiciones de sobre-expresión de Dp53, concordando con los resultados mostrados anteriormente en los que Dp53 está regulando transcripcionalmente a *Notch*.

Para estudiar si el aumento en los niveles de expresión de WG en condiciones de sobre-expresión de Dp53 eran dependientes de la activación de Notch, ya que *wg* se activa a través de la vía de Notch (Baonza and Garcia-Bellido, 2000; Giraldez and Cohen, 2003; Neumann and Cohen, 1996), se analizó la expresión de WG en discos 638-GAL4/+; UAS-Dp53/+; UAS-Notch<sup>RNAi</sup>/+ y se comparó con discos 638-GAL4/+; UAS-Notch<sup>RNAi</sup>/+. En la **Figura 35** se observa que continúa habiendo altos niveles de expresión de WG cuando Notch está inactivo, sugiriendo, una vez más, que Dp53 puede estar activando directamente, a nivel transcripcional, a *wg* para inducir proliferación.

## 4.2.4. – Los efectos de la sobre-expresión de Dp53 son modulados en la falta y la ganancia de expresión de Notch.

Como se ha comentado anteriormente, altos niveles de Dp53 en el “wing pouch” de discos 638-GAL4/+; UAS-Dp53/+ induce apoptosis y proliferación (**Figura 32**). Se analizó en detalle la morfología de los discos imaginales y se observó que eran de tamaño reducido en comparación con discos imaginales de ala silvestre, debido a la inducción de

apoptosis, pero que mostraban crecimientos en el “wing pouch”. Estos crecimientos producidos por el aumento en proliferación sobresalen desde el borde D/V (**Figura 32F-F’** y **Figura 34G-G’ e I-I’**), indicando que la formación del borde D/V está siendo comprometida debido a la inducción de apoptosis en esa región (**Anexo 4**). Por otro lado, la sobre-expresión de Dp53 con la línea 638-GAL4 a 29°C producía retraso en el desarrollo, y aunque se alcanzaba el estadio de pupa la mayoría quedaba sin diferenciar. Cuando los embriones 638-GAL4; *UAS-Dp53/+* se crecían a 25°C se alcanzaba el estadio adulto y estas moscas presentaban alas muy pequeñas y, en ocasiones, duplicaciones de ala y de *notum* (**Figura 32C-C’** y **Anexo 2F**). Finalmente, cuando los embriones 638-GAL4/+; *UAS-Dp53/+* se crecían a 17°C, una alta proporción de moscas no extendía las alas, las que lo hacían tenían las alas con grandes “notchings” en el margen (**Figura 32B**). Estos fenotipos recordaban en gran medida a los producidos por la inducción de apoptosis en el borde D/V (Gullaud M et al, 2003; Delanoue R et al, 2004), que como se ha comentado anteriormente, los altos niveles de expresión de Dp53 impiden que pueda llegar a formarse.

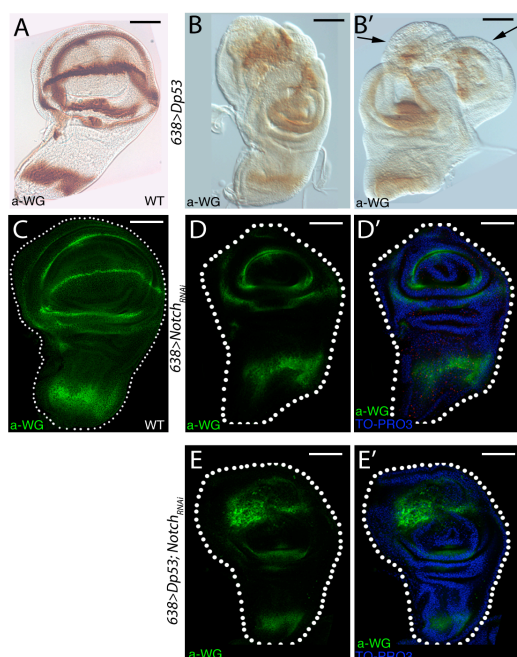


**Figura 34.- Efecto de la sobre-expresión de Dp53 en la expresión de Notch.** **A)** Disco imaginal de ala silvestre mostrando expresión de Notch (marrón). **(B-C)** Discos imaginales de ala 638-GAL4/+; *UAS-Dp53/+*. **B)** Expresión de Dp53 (marrón). **C)** Expresión de Notch (marrón). Nótese el incremento en la expresión de Notch en comparación con A. **D)** Disco imaginal de ala silvestre mostrando expresión de Notch-intra (verde). **(E-E')** Discos imaginales de ala 638-GAL4/+; *UAS-Dp53/+*. **E)** Expresión de Notch-intra (verde). Nótese el incremento en la expresión de Notch-intra (cabeza de flecha) en comparación con D. **E')** Superposición de imágenes mostrando expresión de Notch-intra (verde) y To-pro3 (azul). **F)** Disco imaginal de ala mostrando expresión de Cut (verde). **(G-G')** Discos imaginales de ala 638-GAL4/+; *UAS-Dp53/+*. **G)** Expresión de Cut (verde). Nótese la desaparición de Cut en el borde D/V (flecha) y la presencia de células que expresan Cut (cabeza de flecha) en la región del disco que está proliferando. **G')** Superposición de imágenes mostrando expresión de Cut (verde) y To-pro3 (azul). **H)** Disco imaginal de ala *Ap-lacZ/+* mostrando expresión de lacZ (verde), que delimita el compartimento dorsal del disco, y expresión de To-pro3 (azul). **(I-I')** Discos imaginales de ala *sd-GAL4/+; UAS-Dp53/Ap-lacZ*. **I)** Expresión de lacZ (verde). Nótese como las células del compartimento dorsal, marcadas con lacZ (flecha), migran hacia el compartimento ventral debido a que la formación del borde D/V está comprometida debido seguramente a la inducción de apoptosis. **I')** Superposición de imágenes mostrando expresión de lacZ (verde) y To-pro-3 (azul).

Para estudiar la contribución de la activación de Notch a los fenotipos producidos por los altos niveles de DP53, se crecieron, bien a 17°C o bien a 25°C, los embriones 638-GAL4/+; *UAS-Dp53/+*; *UAS-Notch<sub>RNAi</sub>/+* y los embriones 638-GAL4/+; *UAS-Dp53/+*; *UAS-*



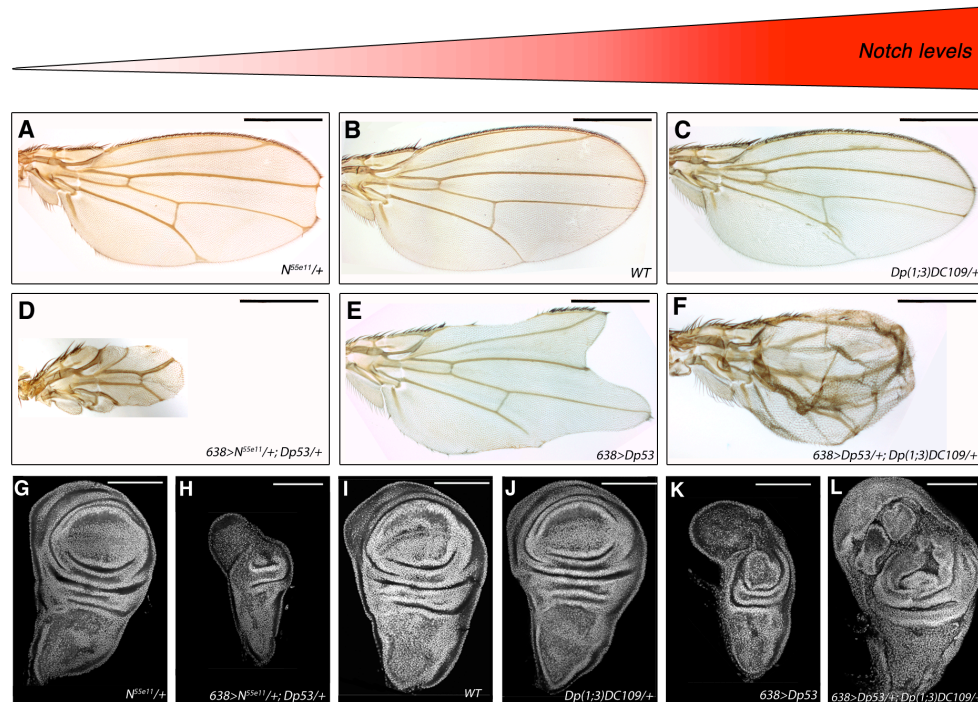
*Notch-intra/+*. Sin embargo, no fue posible hacer una cuantificación de los fenotipos observados ya que tanto la sobre-expresión de Notch (*638-GAL4/+; UAS-Notch-intra/+*) como su inactivación (*638-GAL4/+; UAS-Notch<sup>RNAi</sup>/+*) produce fenotipos muy fuertes en la mosca (de Celis et al., 1996). Por ello, se decidió estudiar la modulación del fenotipo de la sobre-expresión de Dp53, mediada por los niveles de expresión de Notch, haciendo uso de mutaciones de *Notch* (*N<sup>55e11</sup>*, (Kidd et al., 1983)) y de la duplicación genómica de *Notch* (*Dp(1;3)DC109*) y se comparó el fenotipo de las alas de moscas crecidas a 17°C *638-GAL4/+; UAS-Dp53/+* con moscas *N<sup>55e11</sup>/638-GAL4; UAS-Dp53/+* y *638-GAL4/+; UAS-Dp53/+; Dp(1;3)DC109/+*, crecidas en las mismas condiciones. Como se observa en la **Figura 36**, en ausencia de *Notch* se incrementa el fenotipo apoptótico (“*notchings*”) observado en el margen de las alas *638-GAL4/+; UAS-Dp53/+* (compárese **Figura 36D** con **36E**), siendo las alas *N<sup>55e11</sup>/638-GAL4/+; UAS-Dp53/+* mucho más pequeñas. Esto probablemente sea debido a que al impedir la proliferación, debido a la disminución de la expresión de Notch, el efecto apoptótico es más relevante, es decir, que en el balance entre apoptosis y proliferación se ve favorecida la apoptosis. Por otro lado, las alas de las moscas *638-GAL4/+; UAS-Dp53/+; Dp(1;3)DC109/+* muestran un rescate parcial del fenotipo apoptótico, observándose plegamientos, lo que sugiere que en este caso el efecto de inducción de la proliferación es más relevante ya que se han incrementado los niveles de expresión de *Notch*. Similarmente, los discos imaginales de ala *N<sup>55e11</sup>/638-GAL4; UAS-Dp53/+* eran de menor tamaño que los discos *638-GAL4/+; UAS-Dp53/+*, en las mismas condiciones de desarrollo (compárese **Figura 36J** con **36K**), y los discos de alas *638-GAL4/+; UAS-Dp53/+; Dp(1;3)DC109/+* eran de mayor tamaño observándose una mayor proliferación que en discos *638-GAL4/+; UAS-Dp53/+* (compárese **Figura 36K** con **36L**).



**Figura 35.- La sobre-expresión de Dp53 induce activación de WG independientemente de la activación de Notch.** **A)** Disco imaginal de ala silvestre mostrando expresión de Wingless (WG) (marrón) **(B-B')** Discos imaginales de ala *638-GAL4/+; UAS-Dp53/+* mostrando expresión de Wingless (WG) (marrón). Nótese el aumento en la expresión de Wingless comparado con A. En B' puede observarse como está duplicando el disco imaginal de ala (flechas). **C)** Disco imaginal de ala silvestre mostrando expresión de Wingless (WG) (verde). **(D-D')** Discos imaginales de ala *638-GAL4/+; UAS-Notch<sup>RNAi</sup>/+*. **D)** Expresión de Wingless (WG) (verde). Nótese la disminución de tamaño del “wing pouch” en comparación con el “notum”. **D')** Superposición de imágenes mostrando expresión de Wingless (WG) (verde) y To-pro3 (azul). **(E-E')** Discos imaginales de ala *638-GAL4/+; UAS-Dp53/+; UAS-Notch<sup>RNAi</sup>/+*. **E)** Expresión de Wingless (WG) (verde). **E')** Superposición de imágenes mostrando expresión de Wingless (verde) y To-pro3 (azul).



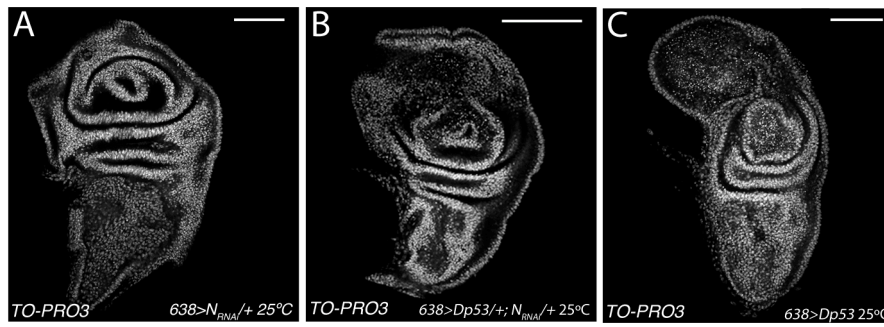
También se analizaron los discos 638-GAL4/+; UAS-Dp53/+ en comparación con discos 638-GAL4/+; UAS-Dp53/+; UAS-Notch<sup>RNAi</sup>/+ y como se observa en la **Figura 37**, el tamaño de los discos 638-GAL4/+; UAS-Dp53/+; UAS-Notch<sup>RNAi</sup>/+ se restaura cuando se compara con discos 638-GAL4/+; UAS-Dp53/+ (compárese **Figura 37B** con **37C**), seguramente debido a que la falta de Notch inhiba la proliferación de las células del disco, sugiriendo que Notch está implicado en la proliferación inducida por los altos niveles de Dp53.



**Figura 36.- Efecto de la modulación de los niveles de expresión de Notch en el fenotipo producido por la sobre-expresión de Dp53 en el ala.** A) Ala *N<sup>55e11</sup>/+*. B) Ala silvestre. C) Ala *Dp(1;3)DC109/+*. D) Ala *638-GAL4/N<sup>55e11</sup>; UAS-Dp53/+*. E) Ala *638-GAL4/+; UAS-Dp53/+*. F) Ala *638-GAL4/+; UAS-Dp53/+; Dp(1;3)DC109/+*. (G-L) Discos imaginales de ala mostrando expresión de To-pro3 (blanco). G) Disco imaginal de ala *N<sup>55e11</sup>/+*. H) Disco imaginal de ala *638-GAL4/N<sup>55e11</sup>; UAS-Dp53/+*. I) Disco imaginal de ala silvestre. J) Disco imaginal de ala *Dp(1;3)DC109/+*. K) Disco imaginal de ala *638-GAL4/+; UAS-Dp53/+*. L) Disco imaginal de ala *638-GAL4/+; UAS-Dp53/+; Dp(1;3)DC109/+*. Nótese la diferencia de tamaño entre las alas D y F debido a la diferencia de la dosis de Notch, una dosis en D y tres dosis en F que esta reflejada en los correspondientes discos imaginales (una dosis en H y tres dosis en L). Las alas proceden de moscas crecidas a 17°C. Los discos imaginales de ala proceden de larvas desarrolladas a 25°C.

#### 4.2.5.- La proliferación generada por los altos niveles de Dp53 no se rescata mediante la inhibición de la apoptosis

Puesto que los altos niveles de Dp53 producían simultáneamente apoptosis y proliferación (**Figura 32**), y nuestros resultados indican que, al menos en parte, esta proliferación está mediada por la activación de la expresión de Notch (**Figura 34**) y parte podría estar siendo debida a la proliferación inducida por apoptosis (Dichtel-Danjoy et al., 2013), se decidió inhibir la apoptosis para analizar la contribución de Notch a dicha proliferación dependiente de apoptosis.

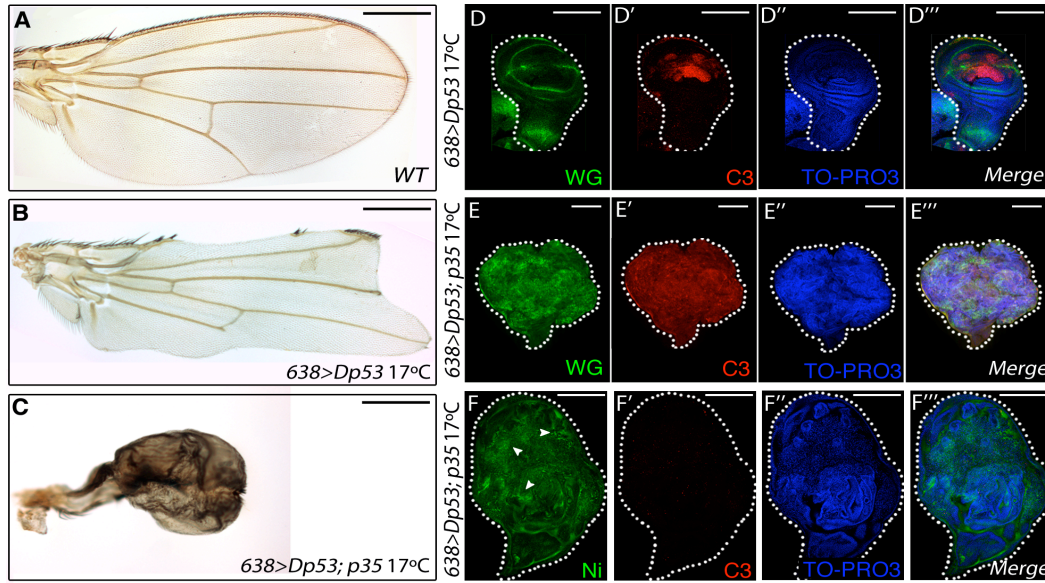


**Figura 37.- La inactivación de Notch rescata parcialmente el fenotipo de sobre-expresión de Dp53 en los discos imaginales.** (A-C) Discos imaginales de ala mostrando expresión de To-pro3 (blanco). **A)** Disco imaginal de ala 638-GAL4/+; UAS-Notch<sub>RNAi</sub>/+. **B)** Disco imaginal de ala 638-GAL4/+; UAS-Dp53/+; UAS-Notch<sub>RNAi</sub>/+. **C)** Disco imaginal de ala 638-GAL4/+; UAS-Dp53/+. Nótese como se rescata el tamaño y la morfología del disco imaginal mostrado en B comparado con C.

Para ello, en primer lugar, se sobre-expresó Dp53 conjuntamente con la proteína P35, el inhibidor de apoptosis de baculovirus, específico de las caspasas efectoras DRICE y Dcp-1 de *Drosophila* (Hay et al., 1994). Se observó que tanto a 29°C como a 25°C se producía letalidad. A 17°C las moscas 638-GAL4/+; UAS-Dp53/+; UAS-p35/+ resultantes no solo no presentaban rescate del fenotipo observado en moscas 638-GAL4/+; UAS-p53/+ (**Figura 32B y 38B**) sino que presentaban un fenotipo más severo: alas no bien extendidas con morfología globosa (**Figura 38C**). Se analizó la expresión de C3 y de WG en discos imaginales de ala procedentes de larvas 638-GAL4/+; UAS-Dp53/+; UAS-p35/+ crecidas a 17°C y se observó que la expresión de C3 se correspondía con caspasa inactiva pero que se inducía una hiperproliferación del tejido acompañado por expresión ectópica de WG por todo el territorio *wing pouch*, quedando el *notum* muy reducido (**Figura 38E-E''**). Esto explicaría que a mayores temperaturas los sobrecrecimientos impidiesen que el desarrollo continuase de forma correcta. Para comprobar si en estas condiciones, en las que se ha inhibido la apoptosis, seguía habiendo altos niveles de Notch, además de altos niveles de WG, se tiñeron los discos 638-GAL4/+; UAS-Dp53/+; UAS-p35/+ con el anticuerpo anti-Notch-intra. Como se observa en la **Figura 38F** se detectaron altos niveles de Notch activado. Estos resultados indican que tanto Notch como WG son activados por los altos niveles de Dp53 independientemente de la inducción de apoptosis, apoyando los resultados de que Dp53 activa transcripcionalmente la expresión de ambos genes.

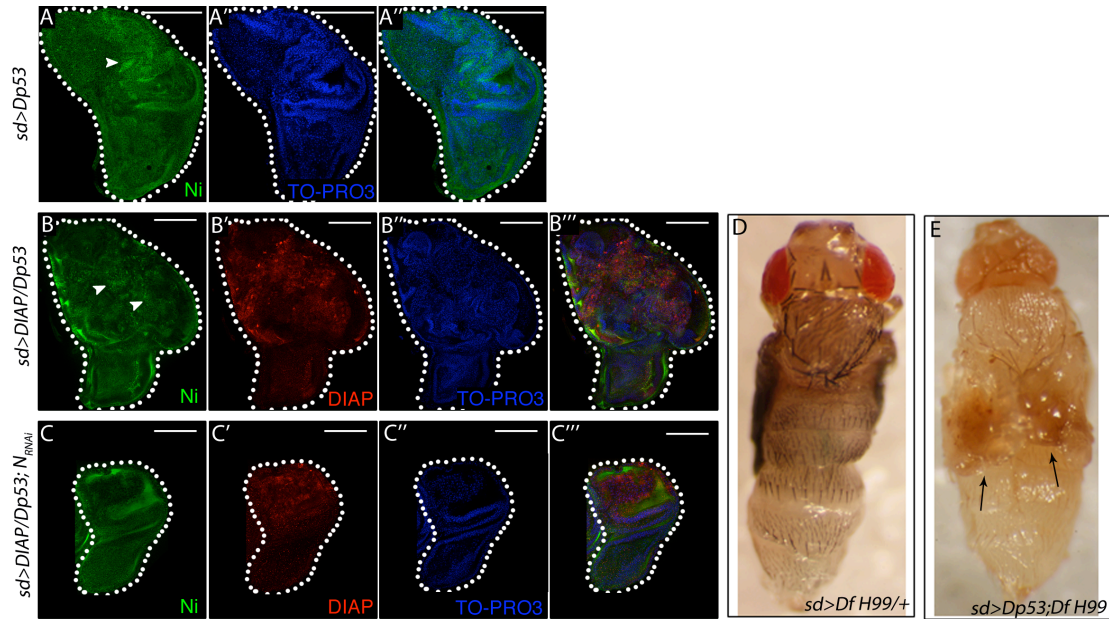
En segundo lugar, se sobre-expresó Dp53 junto con DIAP1 (*Drosophila* *Inhibitors of Apoptosis* *Proteins* 1), observándose también altos índices de letalidad a 25°C y a 29°C. Cuando se analizaron los discos imaginales de larvas *sd*-GAL4/+; UAS-DIAP1/UAS-Dp53 crecidas a 17°C se observó que éstos estaban sobrecrecidos y, además, presentaban altos niveles de expresión de Notch<sub>intra</sub> (**Figura 39B**), sugiriendo nuevamente que la inhibición de la apoptosis hace que la proliferación mediada por Notch sea más relevante. Para comprobar si este fenotipo de sobre-proliferación se modulaba en ausencia de Notch se

analizaron discos imaginales de ala *sd-GAL4/+; UAS-DIAP/UAS-Dp53; UAS-Notch<sup>RNAi</sup>/+* y se compararon con discos *sd-GAL4/+; UAS-DIAP/UAS-Dp53* y como se observa en la **Figura 39C**, el tamaño de los discos está restaurado, e incluso son más pequeños que un disco silvestre. Se obtuvieron resultados similares al fenotipo de sobreproliferación cuando se sobre-expresó Dp53 en un fondo mutante para los genes pro-apoptóticos *rpr*, *hid* y *grim* utilizando la deficiencia genómica H99, que elimina los tres genes simultáneamente (**Figura 39D-E**).



**Figura 38.- Efecto de la inactivación de la apoptosis en el fenotipo producido por la sobre-expresión de Dp53 en el ala.** **A)** Ala silvestre. **B)** Ala 638-GAL4/+; UAS-Dp53/+. **C)** Ala 638-GAL4/+; UAS-Dp53/+; UAS-p35/+. **(D-D''')** Discos imaginales de ala 638-GAL4/+; UAS-Dp53/+. **D)** Expresión de Wingless (WG) (verde). **D')** Expresión de caspasa-3 activada (C3) (rojo). **D'')** Expresión de To-pro3 (azul). **D''')** Superposición de imágenes D, D' y D''. **(E-F''')** Discos imaginales de ala 638-GAL4/+; UAS-Dp53/+; UAS-p35/+. **E)** Expresión de Wingless (WG) (verde). **E')** Expresión de caspasa-3 activada (C3) (rojo). Nótese que la expresión de C3 se corresponde con caspasa inactiva. **E'')** Expresión de To-pro3 (azul). **E''')** Superposición de imágenes E, E' y E''. **F)** Expresión de Notch-intra (verde). Nótese la presencia de elevados niveles de expresión de Notch-intra (cabezas de flecha). **F')** Expresión de caspasa-3 activada (C3) (rojo). **F'')** Expresión de To-pro3 (azul). **F''')** Superposición de imágenes F, F' y F''.

En resumen, estos resultados demuestran que la inducción de proliferación celular podría ser independiente de la inducción de apoptosis. Y no sólo eso, sino que la inhibición de la apoptosis, en un contexto de altos niveles de Dp53, favorece la hiperproliferación del tejido. Además, estos resultados indican que, al menos parcialmente, Notch, cuya sobre-expresión induce crecimientos hiperplásicos (Djiane et al., 2013), es responsable de la proliferación inducida por la sobre-expresión de Dp53 junto con WG.



**Figura 39.- Efecto de la inactivación conjunta de la apoptosis y de Notch en el fenotipo de sobre-expresión de Dp53 en los discos imaginales. (A-A'')** Discos imaginales de ala *sd-GAL4/+; UAS-Dp53/+*. **A)** Expresión de Notch-intra (Ni) (verde) (cabeza de flecha). **A')** Expresión de To-pro3 (azul). **A'')** Superposición de imágenes A y A'. **(B-B''')** Discos imaginales de ala *sd-GAL4/+; UAS-Dp53/UAS-DIAP1*. **B)** Expresión de Notch-intra (Ni) (verde) (cabezas de flecha). **B')** Expresión de Diap1 (rojo). **B'')** Expresión de To-pro3 (azul). **B''')** Superposición de imágenes B y B'. **(C-C''')** Discos imaginales de ala *sd-GAL4/+; UAS-Dp53/UAS-DIAP1; UAS-NotchRNAi/+*. **C)** Expresión de Notch-intra (Ni) (verde). Nótese que no se observa activación de Notch-intra en el "wing pouch". **C')** Expresión de DIAP1 (rojo). **C'')** Expresión de To-pro3 (azul). **C''')** Superposición de imágenes C y C'. **D)** Farato *sd-GAL4/+; DfH99/+*. **E)** Farato *sd-GAL4/+; UAS-Dp53/+; DfH99/+*. Nótese que las alas están sobrecrecidas (flechas) en comparación con D.

#### 4.3.- FUNCIÓN DEL GEN *dRYBP* EN LOS MECANISMOS EPIGENÉTICOS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.

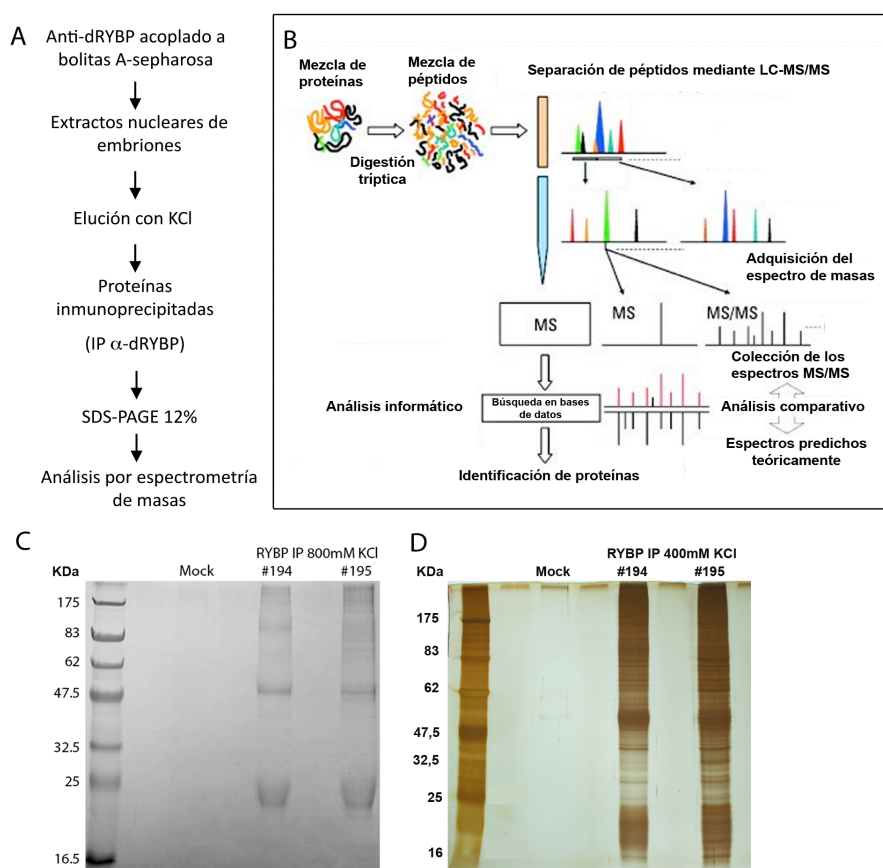
La proteína dRYBP (*drosophila* Ring and YY1 Binding Protein) es una proteína relativamente pequeña (18KDa) y nuclear, que se expresa ubicuamente y a lo largo de todo el desarrollo de la mosca. En su región N-terminal presenta un dominio funcional "Zinc finger" de tipo nucleoporina (NZF, *Nucleoporin Zinc Finger*) (Bejarano et al., 2005) y dentro de este dominio presenta una región muy conservada e importante para la ubiquitinación proteica y/o la interacción con proteínas ubiquitinadas (Arrigoni et al., 2006) (**Figura 9**). Datos previos del laboratorio muestran que tanto su falta como su ganancia de expresión produce fenotipos muy variables tanto en penetrancia como en expresividad (Bejarano et al., 2005; Gonzalez et al., 2008; Gonzalez and Busturia, 2009; Aparicio and Busturia, 2013), sugiriendo que la proteína dRYBP es una proteína implicada en diversos procesos biológicos.

Para entender mejor los mecanismos de acción de la proteína dRYBP en la regulación de la expresión génica se decidió llevar a cabo un análisis de las proteínas que interaccionan con dRYBP mediante técnicas de espectrometría de masas (**Figura 40A y B**) (ver materiales y métodos).



#### 4.3.1.- Búsqueda de proteínas que interaccionan con la proteína dRYBP mediante análisis por espectrometría de masas

Para el análisis de las proteínas que interaccionan con la proteína dRYBP se extrajeron las proteínas nucleares de embriones de 0-24h de *Drosophila* (ver materiales y métodos). Los extractos de proteínas nucleares se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-dRYBP purificado en distintas concentraciones de sal (800mM ó 400mM) (**Figura 40A**). Las proteínas del inmunoprecipitado se separaron mediante SDS-PAGE seguido de tinción con azul de Coomassie y tinción con plata (**Figura 40C y D**). El gel fue enviado al servicio de análisis de espectrometría de masas en el Erasmus Medical Center (Rotterdam) y, posteriormente, se procedió al análisis de los resultados obtenidos basado en el valor estadístico *Mascot Score* de cada proteína identificada (ver **Anexo 6** en el formato digital de la Tesis).



**Figura 40.- Procedimiento seguido para el análisis de las proteínas que interaccionan con dRYBP mediante técnicas de espectrometría de masas. A)** Representación esquemática del procedimiento seguido para la inmunoprecipitación de las proteínas del extracto nuclear de embriones de *Drosophila* con el anticuerpo anti-dRYBP. **B)** Representación esquemática explicativa de la técnica de espectrometría de masas. **C)** Gel SDS-PAGE al 15% teñido con azul de Coomassie conteniendo las proteínas inmunoprecipitadas con anti-dRYBP. **D)** Gel SDS-PAGE al 15% teñido con plata conteniendo las proteínas inmunoprecipitadas con anti-dRYBP.

Los resultados obtenidos del análisis por espectrometría de masas (**Anexo 6**) revelaron que la proteína dRYBP interacciona putativamente con unas 1000 proteínas,

aproximadamente, con un “*Mascot Score*” superior a 60, e involucradas en diversos procesos celulares, como modificación de la cromatina, represión y activación génica, en el proceso de compensación de dosis, regulación del splicing, procesamiento del ARN interferente y en la formación del poro nuclear, sugiriendo nuevamente que la proteína dRYBP es una proteína que participa en diversos procesos biológicos. Es importante tener en cuenta que no todas las proteínas van a interactuar de forma directa con dRYBP sino que muchas habrán sido arrastradas por su interacción con otras proteínas y, por tanto, la interacción puede ser indirecta. En el laboratorio se está llevando a cabo un estudio detallado de los resultados obtenidos para poder definir los procesos biológicos en los que dRYBP podría estar involucrado.

Debido a que la proteína dRYBP había sido clasificada como una proteína ETP (Bejarano et al., 2005; Gonzalez et al., 2008), es decir, que interactúa tanto con proteínas del grupo PcG como trxG, en este trabajo de Tesis se decidió analizar las proteínas PcG/trxG identificadas mediante la técnica de espectrometría de masas con las que dRYBP interactúa.

En la **Tabla 7** se muestran las proteínas PcG/trxG que interactúan con dRYBP y que presentaron un “*Mascot Score*” superior a 60 y que, además, tienen función de modificación post-traducciona de histonas.

| Proteína        | Kda   | Mascot Score | Nº péptidos únicos | Sequence coverage (%) | Dominios  | Actividad bioquímica                         |
|-----------------|-------|--------------|--------------------|-----------------------|---|--|
| Sce/dRING       | 48    | 1250         | 16                 | 50,1                  | RING Zn finger  | E3 ubiquitin ligasa de la H2A                |
| dKDM2 (CG11033) | 151   | 633          | 10                 | 9                     | JmjC; F-box, CXXC Zn finger; PHD finger, repeticiones LRR | H3K36me2 demetilasa, H2A E3-ubiquitin ligasa |
| dBre1           | 119,6 | 620          | 14                 | 17                    | RING Zinc finger  | E3 ubiquitin ligasa de la H2B                |

**Tabla 7.- Proteínas que interactúan con dRYBP identificadas mediante espectrometría de masas.** Sólo se presentan aquellas proteínas con actividad modificadora de histonas que han sido objeto de estudio de este trabajo de Tesis.

SCE/dRING es una proteína E3-ubiquitin-ligasa perteneciente a los complejos PcG PRC1 (Polycomb Repressive Complex 1) y dRAF (dRing-Associated Factors) (Lagarou et al., 2008), implicada en la mono-ubiquitinación de la histona H2A, asociada a silenciamiento génico (Wang et al., 2004).

La proteína dKDM2 contiene varios dominios proteicos conservados, un dominio JmjC (Jumonji C), presente en las proteínas demetilasa de histonas (Klose et al., 2006; Tsukada et al., 2006), un F-box, presente en proteínas que se asocian con SKP1 (S-phase Kinase-associated Protein 1) para formar el complejo E3-ubiquitina-ligasa SCF (Skp1-Cullin-F-box protein) (Cardozo and Pagano, 2004; Jackson and Eldridge, 2002) y un dominio zinc

finger de tipo CXXC, asociado con actividad E3-ubiquitina-ligasa. Esta proteína ha sido caracterizada como proteína perteneciente al complejo dRAF (dRing-Associated Factors), y contiene actividad demetilasa de la histona H3K36me2 y ubiquitin-ligasa de la H2A (Lagarou et al., 2008).

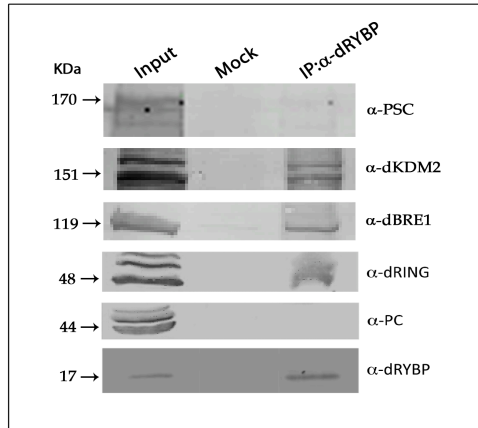
La proteína dBre1 es una E3 ubiquitin-ligasa implicada en activación transcripcional, que monoubiquitina la histona H2B (Espinosa, 2008; Henry et al., 2003; Hwang et al., 2003). Se ha demostrado que esta modificación de la histona H2B es necesaria para la correcta transcripción de los genes diana de la vía de señalización de Notch (Bray et al., 2005). Además, se ha descrito en levaduras que la monoubiquitinación de la histona H2B tiene un papel protector contra la apoptosis, de modo que la proteína Bre1 tendría un papel anti-apoptótico (Fullgrabe et al., 2010; Walter et al., 2010).

Teniendo en cuenta el análisis de las proteínas que interaccionan con dRYBP, que están involucradas en la modificación de histonas, y teniendo en cuenta resultados previos del laboratorio que clasifican a dRYBP como una proteína asociada tanto a proteínas Polycomb como trithorax, se decidió elaborar la hipótesis de que dRYBP podría estar regulando el balance entre la actividad represora mediada por la ubiquitinación de la histona H2A y la actividad activadora mediada por la ubiquitinación de la histona H2B. Así, se decidió estudiar las interacciones tanto genéticamente como bioquímicamente entre las proteínas dRYBP, SCE/dRING, dKDM2 y dBre1 y definir si, en conjunto, todas estas proteínas actúan formando un complejo proteico, así como su caracterización funcional.

#### **4.3.2.- Análisis de las interacciones moleculares de la proteína dRYBP con las proteínas SCE/dRING, dKDM2 y dBre1:**

Para confirmar las interacciones moleculares, obtenidas mediante espectrometría de masas, entre la proteína dRYBP y las proteínas SCE/dRING, dKDM2 y dBre1, se realizaron inmunoprecipitaciones a partir de extractos de proteínas nucleares de embriones de *Drosophila* con el anticuerpo anti-dRYBP purificado, seguido de análisis por Western-Blot usando los anticuerpos anti-dRING/SCE, anti-dKDM2, anti-PC, anti-PSC y anti-Bre1 (ver materiales y métodos). Los resultados que se observan en la **Figura 41** muestran que la proteína dRYBP interacciona molecularmente con SCE/dRING, dKDM2 y dBre1. Como control negativo del experimento se analizó la interacción con la proteína PC, perteneciente al complejo PRC1, ya que resultados previos del laboratorio indicaban que la proteína dRYBP no interaccionaba con PC (Gonzalez et al., 2008) y, además, no aparece como proteína interaccionante en los resultados del análisis mediante espectrometría de masas. Como se muestra en la **Figura 41**, se comprobó que efectivamente dRYBP no interacciona molecularmente con la proteína PC. También, como control negativo, se

analizó la posible interacción de dRYBP con la proteína PSC debido a que es otro de los componentes del complejo dRAF (Lagarou et al., 2008), del que forman parte SCE/dRING y dKDM2, observándose que la proteína dRYBP no interacciona molecularmente con PSC (Figura 41).



**Figura 41.- dRYBP interacciona físicamente con las proteínas del complejo represor dRAF, SCE/dRING y dKDM2, y con la proteína activadora dBRE1.** Extractos de proteínas nucleares de embriones de *Drosophila* fueron inmunoprecipitados con anti-dRYBP acoplado a bolitas de A Sepharosa (IP:dRYBP) o simplemente con bolitas de A Sepharosa (Mock o control negativo). Los precipitados fueron resueltos en un gel SDS-PAGE, transferidos a una membrana de nitrocelulosa y co-inmunoprecipitados con los anticuerpos anti-dRYBP, anti-dRING, anti-dKDM2, anti-dBRE1, anti-PC y anti-PSC.

Los resultados aquí mostrados indican que dRYBP interacciona físicamente con la proteína SCE/dRING en condiciones silvestres. Además, dRYBP también interacciona con dKDM2, pero no con PSC, ni con PC, lo que sugiere que dRYBP podría estar formando un complejo independiente del complejo dRAF, excluyendo a PSC, y que este complejo pudiese estar mediando en el balance entre la actividad de las proteínas PcG/trxG a través de su interacción con la proteína activadora dBre1.

### 4.3.3.- Análisis de las interacciones genéticas entre dRYBP, Sce/dRing, dKdm2 y dBre1.

Para el análisis de las interacciones genéticas entre dRYBP, Sce/dRing, dKdm2 y dBre1, se cuantificó, por una lado, la penetrancia y expresividad de fenotipos homeóticos. Los fenotipos homeóticos analizados para el estudio de las interacciones genéticas asociados a la falta de genes del grupo *Polycomb* fueron: 1) aparición de peines sexuales en las patas 2 y 3 (Pattatucci and Kaufman, 1991). 2) transformación de ala a halterio (Lewis, 1978; Pavlopoulos and Akam, 2011) y 3) pigmentación del cuarto segmento abdominal (Busturia et al., 1989). Los fenotipos homeóticos analizados asociados a la falta de genes del grupo *trithorax* fueron: 1) transformación de halterio a ala (Lewis, 1978) y 2) des-pigmentación del quinto segmento abdominal (Busturia et al., 1989). Por otro lado, se cuantificó la penetrancia del fenotipo de interrupción de la vena 5 que presentan las moscas mutantes homocigóticas para dRYBP<sup>1</sup> (Gonzalez et al., 2008), y la penetrancia de la aparición de ampollas en las alas en-GAL4/+; UAS-dRYBP<sup>RNAi</sup>/+ (Aparicio et al., 2013; Gonzalez et al., 2008).



#### 4.3.3.1.- *dRYBP* interacciona genéticamente con *Sce/dRing* y con *dkdm2*

Las moscas adultas conteniendo mutaciones nulas para el gen *dRYBP* no presentan fenotipos homeóticos (Gonzalez et al., 2008). Por otro lado, las mutaciones nulas para el gen *Sce/dRing* son homocigóticas letales y las moscas heterocigóticas *Sce*<sup>1/+</sup> no presentan fenotipos homeóticos (Breen and Duncan, 1986; Gorfinkiel et al., 2004). Sin embargo, se encontró que moscas *dRYBP*<sup>1/</sup> *dRYBP*<sup>1/</sup>; *Sce*<sup>1/+</sup> muestran con un 86% de penetrancia transformaciones de las patas 2 y 3 a pata 1 (cuantificado por la presencia de peines sexuales) (**Tabla 8**) y, curiosamente, un 68% de penetrancia de transformaciones del segmento abdominal A5 en A4 (cuantificado por la aparición de parches de des-pigmentación en el A5) (**Tabla 8**) (Gonzalez et al., 2008). La aparición de transformaciones homeóticas en estas combinaciones mutantes indican que *dRYBP* interacciona genéticamente con *Sce/dRing*. Por un lado, aparecen fenotipos asociados a la falta de función de los genes *Polycomb* (transformaciones de la pata 2 y 3 a pata 1), descubriendo la función de *dRYBP* en el mantenimiento de la expresión génica junto a las proteínas *Polycomb*. Por otro lado, aparecen fenotipos asociados a la falta de función de los genes *trithorax* (despigmentación del segmento A5), sugiriendo que no sólo *dRYBP* sino también *Sce/dRing* participarían en el mantenimiento de la expresión génica junto con las proteínas *trithorax*.

Resultados previos del laboratorio, también demostraron que moscas *dRYBP*<sup>1/</sup> *dRYBP*<sup>1/</sup>; *trx*<sup>E2/+</sup> presentaban transformaciones homeóticas del segmento abdominal A5 a A4 con un 95% de penetrancia frente a un 34% en moscas *trx*<sup>E2/+</sup> (Gonzalez et al., 2008) (**Tabla 8**). Estos resultados indican que *dRYBP* interacciona genéticamente con proteínas del grupo *trithorax* y, por tanto, sugieren que *dRYBP* podría estar llevando a cabo su función activadora junto con las proteínas *trithorax*.

En este trabajo de Tesis, se analizó la presencia de transformaciones homeóticas en combinaciones de dobles mutantes *Sce*<sup>1</sup> y *trx*<sup>E2</sup> y también en combinaciones de triples mutantes *dRYBP*<sup>1</sup>, *Sce*<sup>1</sup> y *trx*<sup>E2</sup>. Como se muestra en la **Tabla 8**, las moscas *Sce*<sup>1/</sup> *trx*<sup>E2/+</sup> presentaron transformaciones del segmento abdominal A5 a A4 con una penetrancia del 61% frente a un 34% en moscas *trx*<sup>E2/+</sup>. Además, el 80% de las moscas *dRYBP*<sup>1/+</sup>; *Sce*<sup>1/</sup> *trx*<sup>E2</sup> presentaron transformaciones de A5 a A4 frente a un 52% en moscas *dRYBP*<sup>1/+</sup>; *trx*<sup>E2/+</sup> y un 0% en moscas *dRYBP*<sup>1/+</sup>; *Sce*<sup>1/+</sup>. Estos resultados indican que la falta de función de *Sce* aumenta los efectos fenotípicos de la falta de función de *trx* y *dRYBP*, sugiriendo que *Sce* podría estar actuando en el mantenimiento de la expresión

génica activada junto con las proteínas trithorax y dRYBP o bien que podría estar aliviando la represión producida por la falta de activación.

Por otro lado, Lagarou et al., demostraron que la falta de función de *dkdm2* no produce fenotipos homeóticos, sin embargo, *dkdm2* interacciona con *Pc* aumentando los efectos fenotípicos de las mutaciones *Pc*<sup>1</sup> y *Pc*<sup>3</sup>. Además, mutaciones en el gen *dkdm2* suprimían los efectos fenotípicos de las mutaciones *trx*<sup>1</sup> y *ash*<sup>10</sup> (Lagarou et al., 2008). Estos resultados sugieren que *dkdm2* participa en el mantenimiento de la expresión génica reprimida junto a las proteínas del grupo Polycomb.

Por tanto, en este trabajo de Tesis, se analizó si las moscas conteniendo combinaciones mutantes para los genes *dRYBP* y *dkdm2*, por un lado, y *dkdm2* y *Sce/dRing*, por otro, producían fenotipos homeóticos. Se utilizaron los alelos mutantes: *dRYBP*<sup>1</sup>, *dRYBP*<sup>Δ16</sup>, *dRYBP*<sup>Δ55</sup>, *dkdm2*<sup>KG04325</sup>, *dkdm2*<sup>EY01336</sup>, *dkdm2*<sup>ΔG12810</sup> y *Sce*<sup>1</sup>. En ninguna combinación alélica mutante analizada, se observó la presencia de fenotipos homeóticos.

A continuación, se decidió hacer combinaciones de triples mutantes de *dRYBP*, *dkdm2* y *Sce/dRing*, por un lado, y de *dRYBP*, *dkdm2* y *trx*, por otro lado, y analizar la frecuencia de aparición de fenotipos homeóticos. Para ello se utilizaron los alelos mutantes: *dRYBP*<sup>1</sup>, *dkdm2*<sup>KG04325</sup>, *Sce*<sup>1</sup> y *trx*<sup>E2</sup>. Como se observa en la **Tabla 8**, las moscas *dRYBP*<sup>1</sup>/*dRYBP*<sup>1</sup>; *dkdm2*<sup>KG04325</sup>/*Sce*<sup>1</sup> no mostraron transformaciones de las patas 2 y 3 a pata 1 y tan solo con una frecuencia del 6% mostraron des-pigmentación del segmento abdominal A5 frente a un 68% de penetrancia en moscas *dRYBP*<sup>1</sup>/*dRYBP*<sup>1</sup>; *dRing*<sup>1</sup>/+ . Estos resultados indican que la falta de función de *dkdm2* suprime los fenotipos asociados a la falta de función de *dRYBP* y *Sce*, tanto los asociados a la falta de genes del grupo Polycomb (transformaciones de la pata 2 y 3 a pata 1 con 86% de penetrancia), descubriendo una función de *dkdm2* en la activación de la expresión génica, como los asociados a la falta de genes del grupo trithorax (despigmentación del segmento A5 con un 68% de penetrancia), indicando, como ya se había demostrado, que *dkdm2* interviene en los procesos de mantenimiento de la represión junto con proteínas PcG (Lagarou et al., 2008). Cuando se analizó el fenotipo de despigmentación del segmento A5 en moscas *dRYBP*<sup>1</sup>/*dRYBP*<sup>1</sup>; *dkdm2*<sup>KG04325</sup>/*trx*<sup>E2</sup> (**Tabla 8**), se observó que este fenotipo homeótico aparecía con una frecuencia del 30% frente a un 95% en moscas *dRYBP*<sup>1</sup>/*dRYBP*<sup>1</sup>; *trx*<sup>E2</sup>/+, indicando que la falta de función de *dkdm2* suprime los fenotipos de falta de función de *dRYBP* y *trx*, de nuevo demostrando que *dkdm2* actúa como represor de la expresión génica.

| Genotipo  | Peines sexuales en patas 2 y3 (%) | Des-pigmentación del segmento A5 en machos (%) | n   |
|---|-----------------------------------|--|-----|
| +/+; +/+  | 0                                 | 0  | 100 |
| <i>dRing</i> <sup>1</sup> /+  | 0                                 | 0  | 100 |
| <i>dRYBP</i> <sup>1</sup> /+  | 0                                 | 0  | 100 |
| <i>trx</i> <sup>E2</sup> /+   | 0                                 | 34   | 100 |
| <i>dkdm2</i> <sup>KG04325</sup> /+  | 0                                 | 0  | 100 |
| <i>dRYBP</i> <sup>1</sup> /+; <i>dRing</i> <sup>1</sup> /+  | 42                                | 0  | 100 |
| <i>dRYBP</i> <sup>1</sup> / <i>dRYBP</i> <sup>1</sup> ; <i>dRing</i> <sup>1</sup> /+                                | 86                                | 68   | 100 |
| <i>dRYBP</i> <sup>1</sup> /+; <i>trx</i> <sup>E2</sup> /+   | 0                                 | 52   | 100 |
| <i>dRYBP</i> <sup>1</sup> / <i>dRYBP</i> <sup>1</sup> ; <i>trx</i> <sup>E2</sup> /+                                 | 0                                 | 95   | 100 |
| <i>trx</i> <sup>E2</sup> / <i>dRing</i> <sup>1</sup>  | 0                                 | 61   | 20  |
| <i>dkdm2</i> <sup>KG04325</sup> / <i>dRing</i> <sup>1</sup>   | 0                                 | 0  | 45  |
| <i>dkdm2</i> <sup>KG04325</sup> / <i>trx</i> <sup>E2</sup>  | 0                                 | 0  | 21  |
| <i>dRYBP</i> <sup>1</sup> / <i>dRYBP</i> <sup>1</sup> ; <i>dkdm2</i> <sup>KG04325</sup> /+                          | 0                                 | 0  | 100 |
| <i>dRYBP</i> <sup>1</sup> /+; <i>trx</i> <sup>E2</sup> / <i>dRing</i> <sup>1</sup>                                  | nd                                | 80   | 41  |
| <i>dRYBP</i> <sup>1</sup> / <i>dRYBP</i> <sup>1</sup> ; <i>dkdm2</i> <sup>KG04325</sup> / <i>dRing</i> <sup>1</sup> | 0                                 | 6  | 70  |
| <i>dRYBP</i> <sup>1</sup> / <i>dRYBP</i> <sup>1</sup> ; <i>dkdm2</i> <sup>KG04325</sup> / <i>trx</i> <sup>E2</sup>  | 0                                 | 30   | 64  |

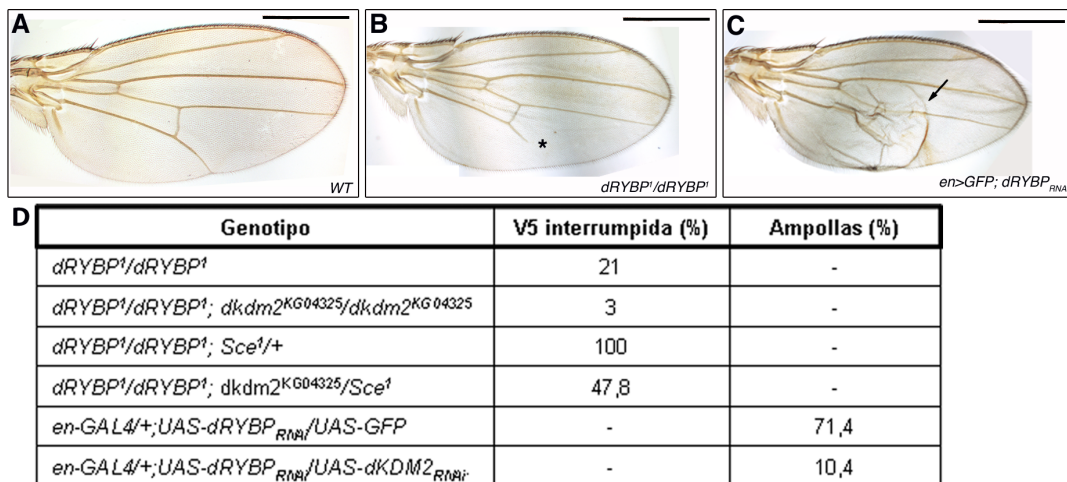
Tabla 8.- Penetrancia, expresada en porcentaje, de los fenotipos homeóticos, que se indican, en moscas conteniendo mutaciones para los genes *dRYBP*, *dRing*, *dkdm2* y *trx*. En azul se indica las moscas silvestres (control del experimento), en naranja los mutantes heterocigotos, en verde las combinaciones de dobles mutantes y en morado las combinaciones de triples mutantes.

Visto que la falta de función de *dkdm2* suprime los fenotipos de falta de función de *dRYBP*, se quiso estudiar si la falta de función de *dRYBP* suprimía también los fenotipos de falta de función de *dkdm2*, que se observan cuando se analizan los fenotipos en moscas dobles mutantes para *dkdm2* y *Pc* (Lagarou et al., 2008). Puesto que ya se había demostrado que *dRYBP* no interaccionaba genéticamente con *Pc* (Gonzalez et al., 2008), pero sin embargo *dkdm2* sí lo hacía (Lagarou et al., 2008), se decidió estudiar si la falta de función de *dRYBP* suprimía los fenotipos de falta de función de *dkdm2* y *Pc*. Para ello se hicieron combinaciones triples mutantes de *dRYBP*, *dkdm2* y *Pc* utilizando los alelos: *dRYBP*<sup>1</sup>, *dkdm2*<sup>KG04325</sup> y *Pc*<sup>3</sup>. Como se muestra en la **Tabla 9**, las moscas *dRYBP*<sup>1</sup>/*dRYBP*<sup>1</sup>; *dkdm2*<sup>KG04325</sup>/*Pc*<sup>3</sup> presentaron un rescate tanto de los fenotipos de aparición de peines sexuales en las patas 2 y 3, como de pigmentación en el segmento abdominal A4 y de transformación de ala a halterio. Estos resultados indican que la falta de *dRYBP* suprime los fenotipos de falta de función de *dkdm2* y *Pc*, y revelan nuevamente la función de *dRYBP* en el mantenimiento de la expresión génica junto con las proteínas trithorax.

| Genotipo   | Peines sexuales en patas 2 y 3 (%) | Pigmentación en segmento A4 (%) | Transformación ala a halterio (%) | n   |
|--|------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|-----|
| +/+;+/+  | 0                                  | 0                               | 0                                 | 100 |
| <i>Pc</i> <sup>3</sup> /+  | 50                                 | 10                              | 18                                | 100 |
| <i>dRYBP</i> <sup>1</sup> /+ ó <i>dRYBP</i> <sup>1</sup> / <i>dRYBP</i> <sup>1</sup>                             | 0                                  | 0                               | 0                                 | 100 |
| <i>dRYBP</i> <sup>1</sup> / <i>dRYBP</i> <sup>1</sup> ; <i>Pc</i> <sup>3</sup> /+                                | 49                                 | 10                              | 16                                | 100 |
| <i>dkdm2</i> <sup>KG04325</sup> / <i>Pc</i> <sup>3</sup>   | 90                                 | 100                             | 60                                | 100 |
| <i>dRYBP</i> <sup>1</sup> / <i>dRYBP</i> <sup>1</sup> ; <i>dkdm2</i> <sup>KG04325</sup> / <i>Pc</i> <sup>3</sup> | 25                                 | 36                              | 39                                | 44  |

**Tabla 9.- Penetrancia, expresada en porcentaje, de los fenotipos homeóticos que se indican en moscas conteniendo mutaciones para los genes *dRYBP*, *dkdm2* y *Pc*.** En azul se indica las moscas silvestres (control del experimento), en naranja los mutantes heterocigotos, en verde las combinaciones de dobles mutantes y en morado las combinaciones de triples mutantes.

En conjunto, estos resultados muestran que *dRYBP* y *dkdm2* se suprimen el uno al otro, lo que podría estar indicando que estas proteínas no actuarían juntas para reprimir o activar a un determinado gen sino que su interacción implicaría inhibición de su función para dejar de reprimir o activar a ese gen.



**Figura 42.- Modulación de los fenotipos de “vena 5 interrumpida” y de presencia de ampollas en el ala de los genotipos que se indican.** A) Ala silvestre. B) Ala *dRYBP*<sup>1</sup>/*dRYBP*<sup>1</sup>. Nótese la interrupción de la vena 5 (asterisco). C) Ala *en-GAL4*/+; *UAS-dRYBP*<sub>RNAi</sub>/*UAS-GFP*. Nótese la presencia de una ampolla en el compartimento posterior (flecha). D) Tabla mostrando la penetrancia (%) de los fenotipos que se indican en moscas conteniendo mutaciones para los genes *dRYBP*, *dkdm2* y *Sce* y en moscas en las que se ha inactivado *dRYBP* y *dkdm2*.

El análisis de las interacciones génicas mediante el estudio de la penetrancia del fenotipo de interrupción de la vena 5 de las alas mutantes para *dRYBP*<sup>1</sup> y de la ampolla en moscas *en-GAL4*/+; *UAS-dRYBP*<sub>RNAi</sub>/*UAS-GFP* se muestra en la **Figura 42**. Sólo un 3% de las moscas *dRYBP*<sup>1</sup>/*dRYBP*<sup>1</sup>; *dkdm2*<sup>KG04325</sup>; *dkdm2*<sup>KG04325</sup> muestran fenotipo de interrupción de la vena 5 frente a un 21% que se observa en moscas *dRYBP*<sup>1</sup>/*dRYBP*<sup>1</sup>. En cambio, en las moscas *dRYBP*<sup>1</sup>/*dRYBP*<sup>1</sup>; *Sce*<sup>1</sup>/+ la penetrancia era del 100%, indicando un aumento de la penetrancia en falta de función de *Sce*. Cuando se analizaron las

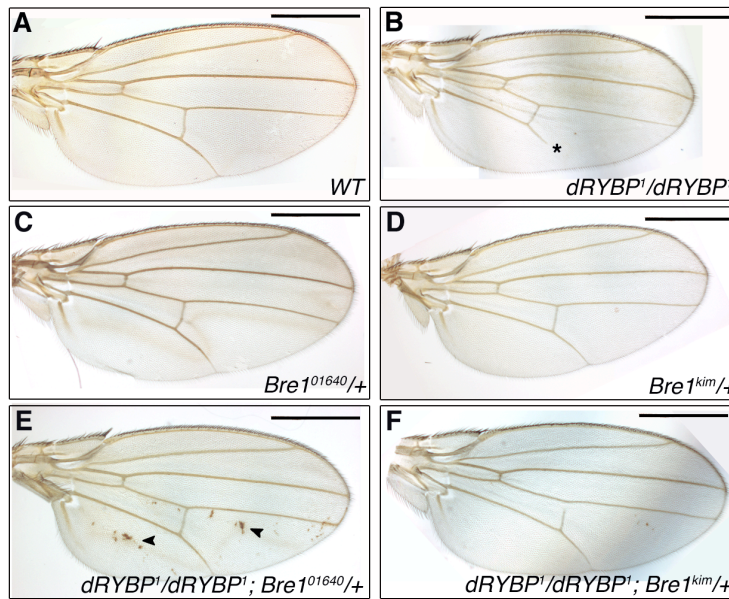
aumento de la penetrancia en falta de función de *Sce*. Cuando se analizaron las combinaciones triples mutantes *dRYBP<sup>1</sup>/dRYBP<sup>1</sup>; dkdm2<sup>KG04325</sup>/Sce<sup>1</sup>* se observó que la penetrancia del fenotipo era del 47,8%. De nuevo, y de acuerdo a los resultados obtenidos del análisis de los fenotipos homeóticos, la falta de *dkdm2* suprime el fenotipo de falta de función de *dRYBP* y *Sce*.

También se observó un rescate en la penetrancia del fenotipo de aparición de ampollas en las alas. Un 71,4% de las moscas *en-GAL4/+; UAS-dRYBP<sup>RNAi</sup>/UAS-GFP* presentaban ampollas en el compartimento posterior comparado con el 10,4% de las moscas *en-GAL4/+; UAS-dRYBP<sup>RNAi</sup>/UAS-dKDM2<sup>RNAi</sup>*.

### 4.3.3.2.- *dRYBP* interacciona genéticamente con *dBre1*

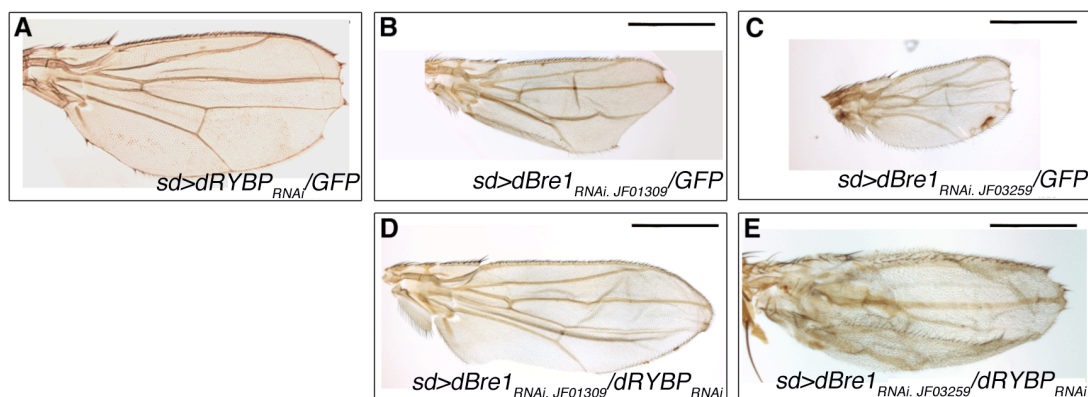
Se estudió si las moscas mutantes para los genes *dRYBP* y *dBre1* presentaban transformaciones homeóticas. Se utilizaron los siguientes alelos mutantes: *dRYBP<sup>1</sup>*, *dRYBP<sup>A16</sup>*, *dRYBP<sup>A55</sup>*, *dBre1<sup>01640</sup>* y *dBre1<sup>kim</sup>* (ver materiales y métodos). La mutación *dBre1<sup>01640</sup>* es letal homocigótica y las moscas adultas *dBre1<sup>01640</sup>/+* no muestran fenotipos homeóticos evidentes, ni cualquier otro fenotipo. Resultados descritos previamente (Bray et al., 2005) mostraron que los clones homocigóticos mutantes para *dBre1* en el ala adulta presentaban fenotipos asociados a la falta de función de *Notch*, como son las indentaciones en el margen de las alas, defectos en las venas y fusión de los tarsos de las patas. La mutación *dBre1<sup>kim</sup>* es homocigótica viable (van der Knaap et al., 2010) y, a diferencia de la anterior, si produce fenotipos homeóticos que están asociados a la falta de función de genes *trithorax*, como son: por un lado, halterios con el tamaño ligeramente aumentado y con tricomas característicos de ala y, por otro lado, despigmentación del segmento abdominal A5 en los machos. Ninguno de los dobles mutantes *dRYBP<sup>1</sup>/dRYBP<sup>1</sup>; dBre1<sup>01640</sup>/+*, *dRYBP<sup>A16</sup>/dRYBP<sup>A16</sup>; dBre1<sup>01640</sup>/+*, *dRYBP<sup>A55</sup>/dRYBP<sup>A55</sup>; dBre1<sup>01640</sup>/+* y *dRYBP<sup>1</sup>/dRYBP<sup>1</sup>; dBre1<sup>kim</sup>/+* analizados mostraron estos fenotipos homeóticos, indicando que la falta de función de *dRYBP* suprime el fenotipo de falta de función de *dBre1*. Sin embargo, si se observó fenotipo en las alas, como indentaciones en el margen del ala, ampollas, venas ectópicas y manchas melanóticas (**Figura 43**). Además, se observó un rescate del fenotipo de la vena 5 interrumpida (compárese **Figura 43E** con **B**), de un 21% en moscas *dRYBP<sup>1</sup>/dRYBP<sup>1</sup>* a un 16% en moscas *dRYBP<sup>1</sup>/dRYBP<sup>1</sup>; dBre1<sup>01640</sup>/+*.





**Figura 43.- dRYBP interacciona genéticamente con dBre1.** A) Ala silvestre. B) Ala *dRYBP<sup>1</sup>/dRYBP<sup>1</sup>*. Nótese la interrupción de la vena 5 (asterisco) y la disminución de tamaño en comparación con A. C) Ala *dBre1<sup>01640</sup>/+*. D) Ala *Bre1<sup>kim</sup>/+*. Nótese la disminución de tamaño en comparación con A. E) Ala *dRYBP<sup>1</sup>/dRYBP<sup>1</sup>; dBre1<sup>01640</sup>/+*. Nótese que el tamaño del ala ha sido restaurado en comparación con B, así como la interrupción de la vena 5. Y, aparecen manchas melanóticas (cabezas de flecha). F) Alas *dRYBP<sup>1</sup>/dRYBP<sup>1</sup>; Bre1<sup>kim</sup>/+*.

También se analizó el fenotipo producido por la inactivación de *dBre1*, utilizando el sistema GAL4/UAS (Brand et al., 1994), y si éste era modulado por la inactivación simultánea de *dRYBP*. Se utilizaron las líneas *UAS-dBre1<sup>RNAi</sup>* (TRiP JF01309), *UAS-dBre1<sup>RNAi</sup>* (TRiP JF03259) y *UAS-dRYBP<sup>RNAi</sup>*. Todos los experimentos se desarrollaron a 29°C. Salvo que se indique lo contrario, los fenotipos que se describen a continuación son los mismos o similares para ambas líneas *UAS-dBre1<sup>RNAi</sup>*. Las moscas *sd-GAL4/+; UAS-GFP/UAS-dBre1<sup>RNAi</sup> JF01309* mostraban alas de tamaño reducido y pérdida de la triple fila con un 100% de penetrancia (Figura 44B). Las moscas *sd-GAL4/+; UAS-GFP/UAS-dBre1<sup>RNAi</sup> JF03259* presentaron un fenotipo muy similar pero con mayor expresividad (Figura 44C). En cambio, tanto las moscas *sd-GAL4/+; UAS-dRYBP<sup>RNAi</sup> /UAS-dBre1<sup>RNAi</sup> JF03259* como *sd-GAL4/+; UAS-dRYBP<sup>RNAi</sup> /UAS-dBre1<sup>RNAi</sup> JF01309* presentaron un rescate del tamaño del ala (Figura 44D y E). En conjunto, todos estos resultados sugieren que la inactivación de *dRYBP* suprime los fenotipos de la inactivación de *dBre1*, de acuerdo a lo observado en el análisis de los fenotipos en los mutantes.

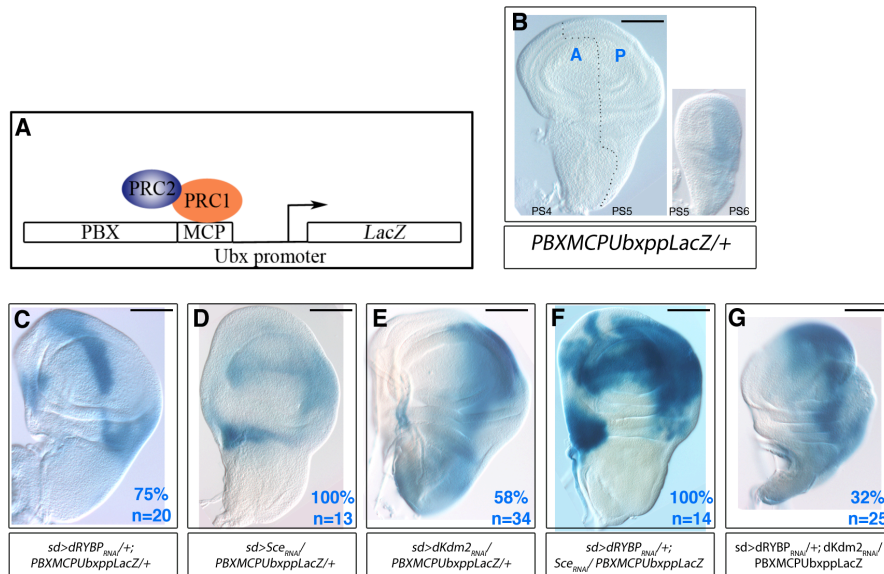


**Figura 44.- La inactivación de dRYBP suprime parcialmente el fenotipo de inactivación de dBre1.** A) Ala *sd-GAL4/+; UAS-dRYBP<sup>RNAi</sup>/UAS-GFP*. B) Ala *sd-GAL4/+; UAS-dBre1<sup>RNAi</sup> JF01309/UAS-GFP*. C) Ala *sd-GAL4/+; UAS-dBre1<sup>RNAi</sup> JF03259/UAS-GFP*. D) Ala *sd-GAL4/+; UAS-dBre1<sup>RNAi</sup> JF01309/UAS-dRYBP<sup>RNAi</sup>*. Nótese el aumento en el tamaño del ala en comparación con B. E) *sd-GAL4/+; UAS-*

*dBre1.JF03259<sup>RNAi</sup>/UAS-dRYBP<sup>RNAi</sup>*. Nótese el aumento en el tamaño del ala en comparación con C.

#### 4.3.4.- *dRYBP* participa junto con *Sce/dRing* y *dkdm2* en el mantenimiento de la expresión mediada por el elemento MCP, un elemento de respuesta a Polycomb del gen *Abdominal-B*.

Se ha descrito previamente que la expresión de la  $\beta$ -galactosidasa dirigida por la construcción *PBXMCPUbxppLacZ* en el disco imaginal de ala se mantiene reprimida durante el desarrollo y que esta represión depende de las proteínas Polycomb (Busturia et al., 2001) (**Figura 45A**). Para estudiar la función de la proteína dRYBP en el mantenimiento de la expresión génica durante el desarrollo, se analizó la expresión de la  $\beta$ -galactosidasa dirigida por la construcción *PBXMCPUbxppLacZ* en los discos imaginales de ala de las larvas: 1) *sd-GAL4/+; UAS-dRYBP<sup>RNAi</sup>/PBXMCPUbxppLacZ*, 2) *sd-GAL4/+; UAS-Sce<sup>RNAi</sup>/PBXMCPUbxppLacZ*, 3) *sd-GAL4/+; UAS-dkdm2<sup>RNAi</sup>/PBXMCPUbxppLacZ*, 4) *sd-GAL4/+; UAS-dRYBP<sup>RNAi</sup>/+; UAS-Sce<sup>RNAi</sup>/PBXMCPUbxppLacZ* y 5) *sd-GAL4/+; UAS-dRYBP<sup>RNAi</sup>/+; UAS-dkdm2<sup>RNAi</sup>/PBXMCPUbxppLacZ*.



**Figura 45.- *dRYBP* participa junto con *dRING/SCE* y *dKDM2* en el mantenimiento de la expresión mediada por el elemento MCP.** A) Esquema de la construcción *PBXMCPUbxppLacZ*. El mantenimiento de la expresión del elemento MCP depende de las proteínas del grupo Polycomb. (B-F) Discos imaginales de ala de moscas B) *PBXMCPUbxppLacZ/+*. B) *sd-GAL4; UAS-dRYBP<sup>RNAi</sup>/PBXMCPUbxppLacZ*. C) *sd-GAL4; UAS-Sce<sup>RNAi</sup>/PBXMCPUbxppLacZ*. D) *sd-GAL4; UAS-dkdm2<sup>RNAi</sup>/PBXMCPUbxppLacZ*. E) *sd-GAL4; UAS-dRYBP<sup>RNAi</sup>/+; UAS-Sce<sup>RNAi</sup>/PBXMCPUbxppLacZ*. F) *sd-GAL4; UAS-dRYBP<sup>RNAi</sup>/+; UAS-dkdm2<sup>RNAi</sup>/PBXMCPUbxppLacZ*.

El patrón de expresión de *lacZ* en los discos imaginales de ala de larvas *PBXMCPUbxppLacZ/+* muestra un borde de expresión en el PS6, es decir, se mantiene reprimido en el compartimento anterior del disco de halterio y tanto en el compartimento anterior como posterior del disco de ala (**Figura 45B**). Dependiendo de la línea *PBXMCPUbxppLacZ* utilizada, se pueden observar, con baja penetrancia, parches de des-represión de *lacZ*, que dependen del lugar de inserción de la construcción

*PBXMCPUbxxpLacZ* en el cromosoma (Busturia et al., 2001). En el caso de la línea *PBXMCPUbxxpLacZ* utilizada para estos experimentos, se observó que los discos imaginales de ala mostraba algunos parches de expresión de LacZ con un 30% de penetrancia. Los discos imaginales de ala de larvas *sd-GAL4/+; UAS-dRYBP<sup>RNAi</sup>/PBXMCPUbxxpLacZ* mostraron des-represión de LacZ con un 75% de penetrancia y expresividad variable, los de larvas *sd-GAL4/+; UAS-Sce<sup>RNAi</sup>/PBXMCPUbxxpLacZ* con un 100% de penetrancia y los de *sd-GAL4/+; UAS-dkdm2<sup>RNAi</sup>/PBXMCPUbxxpLacZ* con un 58% de penetrancia (**Figura 45C-E**). Cuando se inactivaron conjuntamente *dRYBP* y *dRing/Sce* en larvas *sd-GAL4/+; UAS-dRYBP<sup>RNAi</sup>/+; UAS-Sce<sup>RNAi</sup>/ PBXMCPUbxxpLacZ* se observó des-represión de lacZ con un 100% de penetrancia y un aumento de la expresividad (**Figura 45F**). Por el contrario, los discos imaginales de ala de larvas *sd-GAL4/+; UAS-dRYBP<sup>RNAi</sup>/+; UAS-dkdm2<sup>RNAi</sup>/PBXMCPUbxxpLacZ* mostraron des-represión de LacZ con sólo un 32% de penetrancia, lo que equivale a la des-represión observada en los individuos control (**Figura 45G**). De nuevo, la falta de función de *dkdm2* suprime el efecto de falta de función de *dRYBP*, descubriendo sus efectos opuestos en cuanto a su función en el mantenimiento de la represión de la expresión del minigen *PBXMCPUbxxpLacZ*.

Estos resultados sugieren que *dRYBP* estaría actuando junto con *SCE/dRING* sobre el elemento MCP para reprimir la expresión del gen *AbdB* durante el desarrollo imaginal. Y que la interacción entre *dKDM2* y *dRYBP* estaría inhibiendo parcialmente esta función represora.





## DISCUSIÓN

---



Una gran variedad de mecanismos moleculares regulan las respuestas celulares a estímulos extra- e intracelulares, promoviendo que las células diferencien, migren, proliferen, dejen de dividirse o se mueran. Todas estas vías moleculares conducen, en última instancia, a la activación o represión de una serie de genes específicos lo que producirá una determinada respuesta celular. El estudio de estas vías moleculares así como su regulación es importante para conocer el desarrollo de los organismos y la ontogénesis de las enfermedades humanas, como el cáncer, que resulta de fallos en la regulación de estas vías, causando que las células respondan inapropiadamente y proliferen cuándo y dónde no deberían de hacerlo. La proteína Dp53 y los grupos de proteínas Polycomb (PcG) y trithorax (trxG), entre los que se encuentra la proteína dRYBP, juegan un papel importante en la regulación de todas estas vías de señalización, incluidas aquellas que promueven proliferación y apoptosis, manteniendo los estados transcripcionales activos o inactivos de los genes durante las múltiples divisiones celulares que tienen lugar durante el desarrollo de los organismos.

Usando la mosca *Drosophila melanogaster* como sistema modelo, en este trabajo de Tesis, se ha estudiado la función de las proteínas de los grupos Polycomb y trithorax, y de la proteína ETP dRYBP, en los mecanismos de proliferación celular y tumorigénesis y en los mecanismos que promueven muerte celular. Además, siguiendo en la línea del estudio del control del mantenimiento de la homeostasis celular, se ha estudiado también el papel del gen supresor de tumores *Dp53* en el control del balance entre la proliferación celular y apoptosis. Por último, se han analizado los factores que interaccionan con dRYBP, una proteína asociada tanto a proteínas Polycomb como proteínas trithorax, que promueven el balance entre activación y represión génica, confiriendo plasticidad transcripcional, mecanismo instrumental para la homeostasis y, por tanto, para la supervivencia de los organismos.

A continuación, se discutirán los principales descubrimientos que se han realizado durante el desarrollo de esta Tesis.

### **5.1.- FUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS PcG/trxG EN LA REGULACIÓN DE LOS MECANISMOS DE PROLIFERACIÓN Y APOPTOSIS**

#### **5.1.1.- Efecto de la modulación de los niveles de expresión de las proteínas PcG/trxG en la proliferación y apoptosis de los discos imaginales.**

Las proteínas de los grupos Polycomb (PcG) y trithorax (trxG) son importantes para la regulación de los procesos de proliferación y apoptosis, manteniendo inactivos o activos, respectivamente, los estados génicos transcripcionales (Kiefer, 2007) a lo largo de la proliferación celular. Además, muy importantemente, debido a su modo de acción que

incluye la modificación post-traducciona l de las histonas, el sistema de regulación epigenética mediado por PcG/trxG tiene la capacidad de ser dinámicamente modulable para asegurar una homeostasis celular.

Para estudiar cómo la modulación de los niveles de expresión de las proteínas PcG y trxG interviene en los procesos de proliferación celular y apoptosis se ha estudiado los efectos de su sobre-expresión y de su inactivación, utilizando el sistema GAL4/UAS (Brand et al., 1994). Curiosamente, se ha observado cómo la alteración de los niveles de expresión de proteínas pertenecientes a un mismo complejo proteico, represor o activador, tiene efectos diferentes, en unos casos, y muy similares, en otros. Así, por ejemplo, la inactivación de los genes *Sce/dRing* y *Pc*, pertenecientes al complejo represor PRC1, producen alas de tamaño muy reducido, debido a la inducción de apoptosis y a la des-represión de la proteína homeótica UBX en los discos imaginales de ala (**Tabla 6 y Figuras 10 y 11**), sugiriendo que estos genes, en condiciones normales, actuarían como genes anti-apoptóticos. En cambio, la inactivación de los genes *Psc/Su(z)2* y *ph*, también pertenecientes al complejo PRC1, inducen sobrecrecimientos en los discos imaginales de ala, a pesar de la inducción de apoptosis y de la des-represión de UBX (**Tabla 6 y Figuras 10, 11, 13 y 26**), sugiriendo que, en condiciones normales, estos genes actuarían como genes supresores de tumores. En estos casos, donde la respuesta final se traduce en proliferación, la inducción de apoptosis que se observa en los discos imaginales podría ser una respuesta de las células para combatir el exceso de proliferación y tratar así de mantener la homeostasis del tejido, es decir, que la apoptosis sería una consecuencia indirecta y no directa como en el caso de la inactivación de *Sce* y *Pc*. Aunque esta apoptosis parece ser suficiente en algunos casos para impedir la proliferación y cuyo resultado se puede observar en los pocos individuos que alcanzan el estadio adulto y que muestran alas de tamaño reducido (**Tabla 6 y Figura 10**).

Curiosamente, resultados de otros laboratorios han demostrado que la inactivación de los genes *Sce/dRing* y *Pc* en discos imaginales de ojo induce sobrecrecimientos y letalidad en el estadio de pupa (Classen et al., 2009), que es el fenotipo contrario a lo que se observa en el disco imaginal de ala. Esto podría ser debido a la fuerte des-represión de UBX en el ala, que hace que ésta se transforme a halterio y que podría estar impidiendo su proliferación. Sin embargo, cuando se inactivó UBX en moscas *sd-GAL4/+; UAS-Sce<sup>RNAi</sup>/UAS-Ubx<sup>RNAi</sup>* tan sólo se restauró moderadamente el tamaño del ala (**Figura 12C**) y se siguieron detectando altos niveles de C3 en los discos imaginales (**Figura 12D-D''**), por lo que UBX no puede ser el responsable de que en el contexto celular de ala la inactivación de *Sce* no resulte en sobre-proliferación, lo que sugiere que en el contexto de ala se deben estar activando otros genes diferentes a los del ojo. Este

hecho pone de manifiesto que los genes PcG/trxG en *Drosophila* actúan de manera dependiente de contexto, al igual que en vertebrados.

Además, estudios recientes han revelado que existen 2 clases de genes diana para las proteínas del PRC1 (Gutierrez et al., 2012). La clase I comprende aquellos genes que son des-reprimidos en fondo mutante para cualquiera de las subunidades que componen el PRC1, como son los genes homeóticos. La clase II comprende aquellos genes que sólo se des-reprimen en ausencia de *Psc/Su(z)2* y *ph*, como son los genes *even-skipped* (*eve*), *dachshund* (*dac*) o *prospero* (*pros*). Esto podría explicar los diferentes efectos que se observan cuando se inactivan, por un lado, los genes *Sce/dRing* y *Pc*, y, por otro, los genes *Psc/Su(z)2* y *ph*. En este contexto *Ubx* sería claramente un gen perteneciente a la clase I, ya que se des-reprime en todos los casos (**Tabla 6 y Figuras 11, 22 y 26**), al igual que podría serlo el gen pro-apoptótico *rpr*, que contiene PREs (Zhang et al., 2008), ya que también se produce apoptosis en todos los casos en los que se inactivaron estas proteínas (**Tabla 6 y Figuras 11, 21 y 26**). Mientras que el gen *outstretched* (*os*), que también contiene PREs (Schuettengruber et al., 2009; Zhang et al., 2008) y que codifica para el ligando de la vía JAK/STAT (Hombria and Brown, 2002), podría ser un gen perteneciente a la clase II, ya que sólo se des-reprime cuando se inactiva *ph* (**Figura 27**) y, al menos en el ojo, también cuando se inactiva *Psc/Su(z)2* (Classen et al., 2009).

### 5.1.2.- Efecto de la modulación de los niveles de expresión de la proteína dRYBP en la apoptosis.

Resultados previos del laboratorio mostraron que la sobre-expresión de la proteína dRYBP induce apoptosis en los discos imaginales de las larvas dando como resultado fenotipos apoptóticos en los individuos adultos (Gonzalez and Busturia, 2009) (**Tabla 6 y Figura 15**). En este trabajo de Tesis se han estudiado algunos de los factores que pueden estar implicados en la inducción de apoptosis en condiciones de sobre-expresión de dRYBP. Estudios en mamíferos han indicado que la inducción de apoptosis mediada por RYBP (el homólogo en mamíferos al gen dRYBP de *Drosophila*) es específica de células tumorales y que, además, se aumenta en presencia de la proteína Apoptina, una proteína viral que posee capacidad apoptótica limitada hacia las células tumorales (Danen-van Oorschot et al., 2004; Tavassoli et al., 2005). Esto sitúa a la proteína RYBP como posible diana terapéutica. El estudio del requerimiento funcional de la proteína Apoptina en la inducción de apoptosis mediada por dRYBP está siendo llevado a cabo en el laboratorio, para lo que se han generado moscas transgénicas portadoras de la construcción UAS-EGFP-APOPTINA, y se están realizando experimentos de sobre-expresión concomitante de dRYBP y Apoptina tanto en condiciones normales como en condiciones específicamente tumorales, por ejemplo, en condiciones de sobre-expresión para las proteínas Delta y Ras

v<sup>12</sup>, que inducen proliferación aberrante y formación de tumores en *Drosophila* (Ferres-Marco et al., 2006). Los resultados de estos experimentos nos ayudarán a dilucidar sobre el papel de la proteína dRYBP en situaciones tumorales y quizás poder extrapolar estos resultados a vertebrados.

Por otro lado, estudios llevados a cabo en mamíferos, han revelado que en condiciones de estrés celular, la proteína RYBP se comporta como un modulador negativo de la E3-ubiquitin ligasa MDM2 (Chen et al., 2009), que es la principal proteína que regula post-traduccionamente a P53. La unión RYBP:MDM2 a través de su dominio NZF induce un cambio conformacional en la proteína MDM2 de modo que ésta ya no puede unirse a P53 y, por tanto, no puede ubiquitinarla para enviarla a degradación vía proteasoma. Cuando se analizó, en *Drosophila*, si la apoptosis producida por los altos niveles de dRYBP eran o no dependientes de *Dp53*, en moscas *sd-GAL4/+; UAS-dRYBP/UAS-Dp53<sup>RNAi</sup>*, se observó que esta apoptosis se rescataba cuando se inactivaba *Dp53* (**Figura 15**). Estos resultados indican que la apoptosis inducida por la sobre-expresión de dRYBP es dependiente de *Dp53*. Sería interesante estudiar en *Drosophila* si los altos niveles de dRYBP hacen que esta proteína sea capaz de reclutar a otras proteínas E3-ubiquitin ligasas, a través de su dominio NZF, para impedir la degradación de *Dp53*, estabilizando sus niveles e induciendo apoptosis. En el laboratorio, se está llevando a cabo un estudio sobre las proteínas E3-ubiquitin ligasas que podrían ser homólogas funcionales de MDM2, ya que la proteína MDM2 carece de homólogo de secuencia en *Drosophila*, y que, además, interaccionen con dRYBP. También se observó que la apoptosis producida por la sobre-expresión de dRYBP era dependiente de la vía JNK, otra vía implicada en los mecanismos de inducción de apoptosis en respuesta a estrés (revisado en (Igaki, 2009; Kanda and Miura, 2004)). En conjunto, estos resultados sugieren que dRYBP tiene una importante función en los mecanismos de regulación de la apoptosis en respuesta a estrés, si bien hasta ahora no se han encontrado en respuesta a qué señal de estrés se aumentan los niveles de dRYBP.

Curiosamente, la inactivación de dRYBP también induce apoptosis en los discos imaginales de la mosca aunque a muy bajos niveles y se ha observado que esta apoptosis es dependiente de los niveles de expresión de *Dp53* y *rpr* y también de la proteína DIAP1. Resultados obtenidos en el laboratorio indican que dRYBP podría estar formando un complejo con proteínas del complejo E3-ubiquitin ligasa SCF (Bocca et al., 2001) para inhibir la apoptosis a través de la degradación vía proteasoma de la proteína Rpr (Ferreres, S., Simón, R. and Busturia, A., (2013) en revisión). Estos resultados sugieren que dRYBP podría estar formando complejos con otras E3-ubiquitin ligasas por medio de la interacción

de su dominio NZF, además de con dRING/SCE y dBRE1, lo cual ha sido objeto de estudio en esta Tesis (apartado 4.3 ) y que se discutirá en el apartado 5.3.

### 5.1.3.- Efecto de la modulación de los niveles de expresión de la proteína PH en la inducción de la proliferación y la apoptosis de los discos imaginales de ala.

En este trabajo de Tesis se ha estudiado la función de la proteína PH, perteneciente al complejo PRC1 del grupo de proteínas Polycomb (PcG), en el ala de *Drosophila*. Se ha observado que altos niveles de PH inducen crecimientos hiperplásicos mediante la activación de la vía de señalización JAK/STAT y de los factores mitogénicos WG, DPP y dMYC. Además, estos crecimientos van acompañados de apoptosis y de cambios en la identidad celular. Sin embargo, la inactivación de la expresión de PH induce sobrecrecimientos de carácter neoplásico en los que la activación de la cascada de señalización de JAK/STAT, así como WG y DPP, desempeñan también un importante papel.

Las principales diferencias que se observaron en los sobrecrecimientos inducidos por la sobre-expresión *versus* la inactivación de la expresión de la proteína PH fueron: 1) crecimiento hiperplásico (**Figura 20**) *versus* crecimiento neoplásico (**Figura 25**). 2) Débil cambio de identidad celular *versus* fuerte cambio de identidad celular (compárese **Figura 22** con **Figura 26**). 3) Fuerte inducción de apoptosis (**Figura 21**) *versus* escasa inducción de apoptosis (**Figura 26**).

Trabajos simultáneos de otros laboratorios demostraron que la inactivación de la expresión de la proteína PH, mediante clones de falta de función en el disco imaginal de ojo (Classen et al., 2009; Martinez et al., 2009), produce la activación de la vía de Notch (Martinez et al., 2009), mientras que el trabajo presentado en esta Tesis demuestra que la inactivación de *ph* en el disco de ala produce la activación de la vía JAK/STAT (**Figura 27**), poniendo de manifiesto nuevamente que las proteínas PcG/trxG actúan de manera dependiente de contexto.

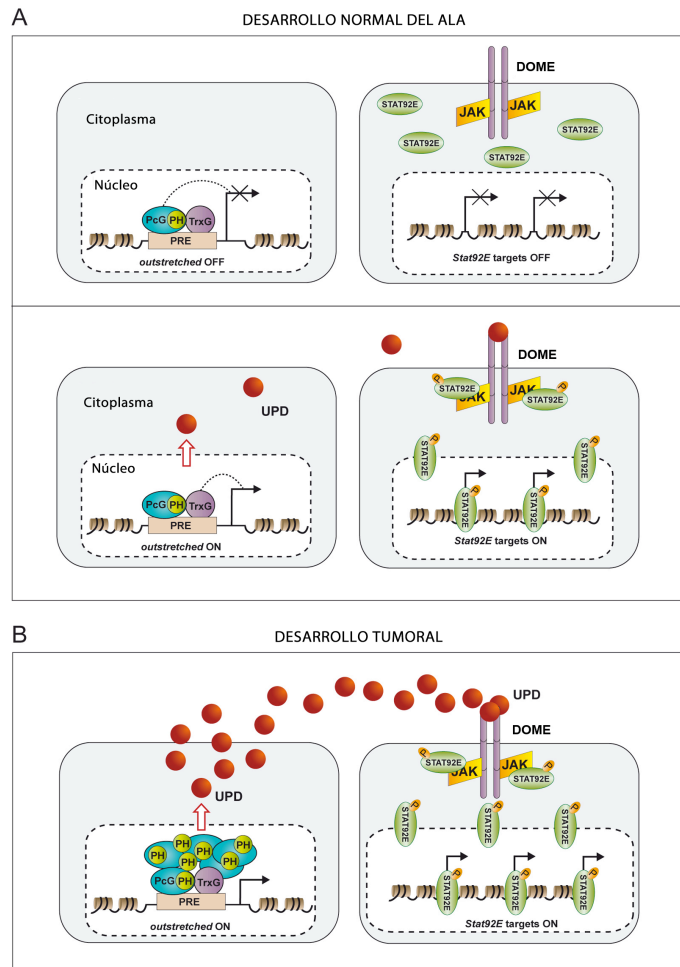
Los resultados presentados en esta Tesis demuestran que PH podría estar actuando directamente sobre la expresión de los genes *outstretched* y *dpp* (**Figuras 23 y 27**), ya que en ambos genes se han encontrado PREs (Oktaba et al., 2008; Schuettengruber et al., 2009). Sin embargo, en el caso de *dpp*, podría ser también que se estuviese activando su expresión debido a la formación de nuevos bordes en el disco o bien que se activase como consecuencia de la activación de la vía JAK/STAT, como ya se ha descrito en estudios recientes en el ovario de *Drosophila* (Lopez-Onieva et al., 2008; Wang et al., 2008). Los resultados obtenidos cuando se analizaron los discos *sd-GAL4/+; dpp-lacZ/+; UAS-PH-GFP/+* (**Figura 23**) y *nb-GAL4/dpp-lacZ; UAS-phRNAi/+* (**Figura 27**)



nos están indicando que la activación de DPP en condiciones de sobre-expresión e inactivación de *ph* no puede ser totalmente un efecto directo de PH sobre DPP ya que la construcción *dpp-lacZ* que se utilizó para hacer estos experimentos (ver materiales y métodos) no incluye el PRE, pero sí contiene 8 sitios de unión para la proteína STAT (**Anexo 1**), lo cual apoya la idea de que *dpp* pueda estar siendo activado, al menos parcialmente, vía JAK/STAT.

La activación de apoptosis que se observa tanto en los sobrecrecimientos producidos por los altos niveles de PH (**Tabla 6 y Figura 21**) como por su inactivación (**Tabla 6 y Figura 26**) puede ser debida a la des-represión de los genes pro-apoptóticos, como *reaper* que contiene PREs (Zhang et al., 2008), pero también puede ser adicionalmente debida a la formación de una discontinuidad en la recepción de las señales de DPP o WG (Adachi-Yamada et al., 1999). También, la apoptosis se podría estar activando como respuesta de las células del tejido para limitar la tasa de proliferación. A su vez, la activación de dMyc que se observa en los sobrecrecimientos producidos por la sobre-expresión de PH, puede también contribuir a la generación de apoptosis, ya que se ha observado que altos niveles de la proteína dMyc inducen apoptosis en las células vecinas (de la Cova et al., 2004; Moreno and Basler, 2004). No obstante, la apoptosis que se observa en los discos imaginales de ala en los que se ha inactivado la expresión de PH es mucho menor y, de hecho, no es frecuente encontrarla en este tipo de crecimientos en los que se ha afectado la integridad epitelial (Herranz et al., 2012).

Debido a todos estos resultados y puesto que altos y bajos niveles de PH inducen proliferación se podría clasificar a *ph* tanto como un oncogen como un gen supresor de tumores (Oktaba et al., 2008). Este comportamiento dual de *ph* podría explicarse por la diversidad en la naturaleza y el amplio rango de genes diana sobre los que actúan los genes *PcG/trxG*. Los resultados de este trabajo de Tesis sugieren que durante el desarrollo normal de los organismos, las proteínas *PcG/trxG* actúan manteniendo inactiva o activa la vía JAK/STAT según se requiera, y que bajo condiciones de estrés, los niveles de expresión de las proteínas *PcG* cambian (por ejemplo, aumentando) induciendo una sobre-activación de la vía JAK/STAT y, por tanto, una sobreproliferación, lo cual se traduce en la formación de tumores (**Figura 46**).



**Figura 46.- Modelo propuesto para explicar el control del estado de activación de la vía JAK/STAT por las proteínas PcG/trxG. A)** Las proteínas PcG/trxG se unen al PRE localizado en el gen *outstretched* y controlan epigenéticamente su estado transcripcional. La activación o represión de *outstretched* es modulado en respuesta a los requerimientos de expresión de Unpaired para el desarrollo normal del ala. **B)** Bajo condiciones de estrés, los niveles de expresión de las proteínas PcG/trxG se modifican sobre-activando la expresión de Unpaired con la consecuente activación aberrante de la vía JAK/STAT y la formación de tumores.

Los resultados presentados en este trabajo de Tesis muestran una relación funcional entre el control de la expresión génica mediado por las proteínas PcG y la vía JAK/STAT, ambos encontrados alterados en los procesos tumorigénicos. Las señales específicas que modulan la actividad y/o los niveles de expresión de las proteínas PcG/trxG en el desarrollo normal y patológico aún se desconocen. No obstante, estos resultados nos abren el camino para el estudio de los mecanismos moleculares de las proteínas PcG/trxG y de los factores involucrados en el control de la plasticidad celular.

Quedaría por determinar cuales son los genes que se activan de forma diferencial y que dan lugar, en un caso, a crecimientos hiperplásicos, y en otro, a neoplásicos. Para ello, se están realizando experimentos de expresión genómica global (Simón, R. et al., en progreso) para poder diferenciar los genes que se activan o reprimen en discos imaginales de ala *sd-GAL4/+; UAS-ph-GFP/+* y *sd-GAL4/+; UAS-ph<sub>RNAi</sub>/+*.

### 5.2.- *Drosophila* Dp53 REGULA LA EXPRESIÓN DE NOTCH PARA ASEGURAR UN BALANCE HOMEOSTÁTICO ENTRE PROLIFERACIÓN Y APOPTOSIS

Debido a que los procesos de proliferación y apoptosis están comúnmente comprometidos durante el desarrollo de enfermedades tales como el cáncer, genes como *p53* y *Notch* juegan un importante papel en tumorigénesis cuando están desregulados. De hecho, la mayoría de los tumores humanos presentan mutaciones en el gen *p53*, poniendo de relevancia su importancia para prevenir la tumorigenesis (Hollstein et al., 1991). También la desregulación de la vía de señalización de Notch está asociada con el desarrollo de muchos tipos de cáncer, como el cáncer de mama o de pulmón, donde la amplificación de la vía de Notch induce un incremento en proliferación y progresión del tumor (Ranganathan et al., 2011). En *Drosophila*, se ha demostrado que moscas mutantes homocigóticas para *Dp53* son más sensibles a las dosis de irradiación que las moscas silvestres (Lee et al., 2003). Recientemente, se ha demostrado que *Dp53* es necesario para el proceso de regeneración (Wells and Johnston, 2012). Por otro lado, la sobre-activación de la vía de Notch induce crecimientos hiperplásicos (Djiane et al., 2013). Por todo ello es muy importante que haya una adecuada regulación de todas estas vías, manteniéndose un balance entre los procesos de proliferación y apoptosis para el desarrollo normal de los individuos.

En este trabajo de Tesis, se ha estudiado la función de *Dp53* en el control de la proliferación y de la apoptosis usando el disco imaginal de ala de *Drosophila* como modelo de estudio. Para ello, en primer lugar se realizó en el laboratorio una búsqueda de genes que interaccionasen genéticamente con el gen *Dp53* y que estuviesen involucrados en los procesos de proliferación y apoptosis, y se encontró que tanto el gen *Notch* como el gen *wg* interaccionaban genéticamente con *Dp53* (**Figuras 28 y 29**), sugiriendo que *Dp53* podía estar regulando transcripcionalmente a ambos genes. De hecho, en mamíferos, la interacción entre las vías de Notch, Wnt y *p53* tiene lugar a múltiples niveles. Así, por ejemplo, Notch puede regular la actividad de *p53* y, recíprocamente, *p53* puede regular a Notch, a través de bucles de retroalimentación tanto positiva como negativa que son los responsables de la proliferación celular y el desarrollo del cáncer (revisado en (Dotto, 2009)). Y uno de los mecanismos de control de la actividad de Notch por *p53* es a nivel de la transcripción de *Notch1*. Así, *p53* KO en queratinocitos primarios humanos resulta en la disminución de los niveles de expresión de *Notch1*, mientras que elevados niveles de *p53* induce un aumento en sus niveles de expresión (Lefort et al., 2007; Yugawa et al., 2007).

El análisis bioinformático de las regiones genómicas de los genes *N* y *wg* reveló la presencia de 11 sitios putativos de unión para *Dp53* en la secuencia del gen *N* y 10 en el

gen *wg* (**Figuras 29 y 30**). Para comprobar si estos sitios de unión para DP53 eran funcionales se analizó, en primer lugar, el grado de conservación de estos sitios en comparación con otras especies de *Drosophila* (**Figura 30F-G**), y en segundo lugar, se realizó una búsqueda de construcciones disponibles en la comunidad científica que contuviesen secuencias cis-reguladoras de ambos genes fusionadas a alguna proteína reportera, como GFP, y que cubrieran las regiones genómicas donde se localizaban estos sitios de unión para poder analizar su expresión en un fondo mutante para *Dp53*. Se pudo disponer de la construcción *pGR-NRE* (cedida por la Dra. Sarah Bray) (Housden et al., 2012) que contiene una secuencia cis-reguladora del intrón V del gen *Notch* (**Figura 30A**) y la proteína GFP como reportera de la expresión. Los resultados presentados en la **Figura 30B-E** muestran que Dp53 regula la expresión de *Notch* a nivel transcripcional, siendo la primera vez que se describe esta regulación en *Drosophila*. En el laboratorio se están llevando a cabo las mutaciones de estos sitios de unión de Dp53 en el gen *Notch* para estudiar su importancia en la regulación de Notch y además, se está llevando a cabo la obtención de transformantes *pUAST-Dp53* que contienen mutaciones puntuales en el dominio de unión al ADN (Herzog et al., 2012), para demostrar la posible función de la unión de Dp53 a los elementos cis reguladores en el gen *Notch*. Los resultados de estos experimentos demostrarán, por primera vez en *Drosophila*, la regulación a nivel transcripcional de Dp53 sobre el gen *Notch* (**Simón, R.** et al., en progreso).

Por otro lado, los resultados presentados en este trabajo de Tesis demuestran que altos niveles de Dp53, obtenidos mediante la sobre-expresión de la isoforma DΔNp53, (Dichtel-Danjoy et al., 2013), no sólo inducen la expresión de WG sino también de Notch, además de la producción de apoptosis y de la activación de la vía JNK (**Figura 32 y Anexo 3**). Estos resultados reafirman que Dp53 pueda estar regulando transcripcionalmente a *Notch* para aumentar sus niveles de expresión. Y concuerdan también con resultados previos obtenidos en *Drosophila*, en los que haciendo una búsqueda de modificadores del fenotipo de ganancia de función de *Hairless* (*H*), que es antagonista de la vía de Notch (Morel et al., 2001), se encontró que la sobre-expresión de Dp53 actuaba como supresor del fenotipo de sobre-expresión de H (Muller et al., 2005), lo que podría explicarse por el hecho de que altos niveles de DP53 aumentan los niveles de Notch en el ojo, al igual que ocurre en el ala. Además, el hecho de que los altos niveles de DP53 activen la expresión de Notch, sugiere que la vía de Notch podría estar también implicada en la denominada proliferación compensatoria inducida por Dp53 (Dichtel-Danjoy et al., 2013).

Recientemente, se ha acuñado el término de “proliferación inducida por apoptosis” para referirse a la proliferación compensatoria dependiente de genes que inducen

apoptosis, especialmente de las caspasas, que son las ejecutoras de la muerte celular (Fan and Bergmann, 2008; Galliot and Chera, 2010) (recientemente revisado en (Ryoo and Bergmann, 2012)). Diversos estudios genéticos en *Drosophila* han identificado 2 vías diferentes por las que se produce la proliferación inducida por apoptosis: la primera es dependiente de la caspasa iniciadora DRONC, pero independiente de las caspasas efectoras DRICE y DCP-1; la segunda es dependiente de las caspasas efectoras. La primera tiene lugar en las denominadas “*undead cells*”, que son células en las que el programa apoptótico ha sido iniciado pero no es ejecutado porque las caspasas efectoras DRICE y DCP-1 están bloqueadas por la expresión del factor p35 (Huh et al., 2004; Perez-Garijo et al., 2004; Ryoo et al., 2004), revelando una función proliferativa para la caspasa iniciadora DRONC. Es en esta vía donde interviene la activación de la vía JNK, que junto con Dp53, induce la expresión de los genes proapoptóticos *rpr* y *Hid* estableciéndose un bucle de retroalimentación positiva para la amplificación de la apoptosis (Shlevkov and Morata, 2012; Wells and Johnston, 2012). JNK y Dp53 también estimulan la expresión de los mitógenos WG y DPP para promover la proliferación de las células vecinas. Sin embargo, aún se desconoce cómo DRONC estimula la activación de JNK y Dp53 y cómo estos dos factores promueven la activación de WG y DPP, por un lado, y la activación de los genes pro-apoptóticos, por otro lado. El mantenimiento de este mecanismo induce la formación de crecimientos hiperplásicos. Wells B. S. et al., proponen que Dp53 tiene una función ancestral que promueve la supervivencia del organismo a través de la coordinación de las respuestas que inducen proliferación compensatoria tras un daño tisular.

Los resultados presentados en este trabajo de Tesis sugieren que Dp53 es capaz de promover apoptosis y proliferación simultáneamente en el disco imaginal de ala, siendo la proliferación el resultado de la activación transcripcional de *wg* y *Notch*. No obstante, a diferencia de WG que es un morfógeno y que, por tanto, puede difundir a las células vecinas, Notch es una proteína transmembrana que actúa como receptor (Bray, 2006; Lai, 2004) y, por tanto, no es una molécula difusible. Ya que no tendría sentido que Dp53 promoviese apoptosis y activación de Notch para inducir proliferación en una misma célula y en base a los resultados que se muestran en la **Figura 34**, en los que se observa que dentro del dominio donde se está sobre-expresando Dp53, las células que expresan Notch, y que, por tanto, están proliferando, son distintas a las que se están muriendo, detectadas por la expresión de C3, proponemos que dependiendo de los niveles de expresión de Dp53, que no siempre son homogéneos en todas las células cuando se activa su expresión mediante el uso del sistema GAL4/UAS (**Figura 31B'** y **34B**), se activa la apoptosis en unas células y la proliferación en otras. Por ejemplo, la línea *sd-GAL4* dirige la expresión más fuertemente en el borde D/V y próximo al borde A/P, de modo que estas células tendrán niveles mayores de Dp53 que el resto de las células del *wing pouch* (**Figura**

**31B).** Las células del borde D/V se corresponden con las células que mueren por apoptosis, de ahí que el borde D/V no se forme (**Figura 34G e I y Anexo 4**), en el resto de las células del *wing pouch*, dónde los niveles de expresión de Dp53 no son tan altos, el balance entre apoptosis y proliferación es favorable a esta última y, por tanto, se activa la vía de Notch.

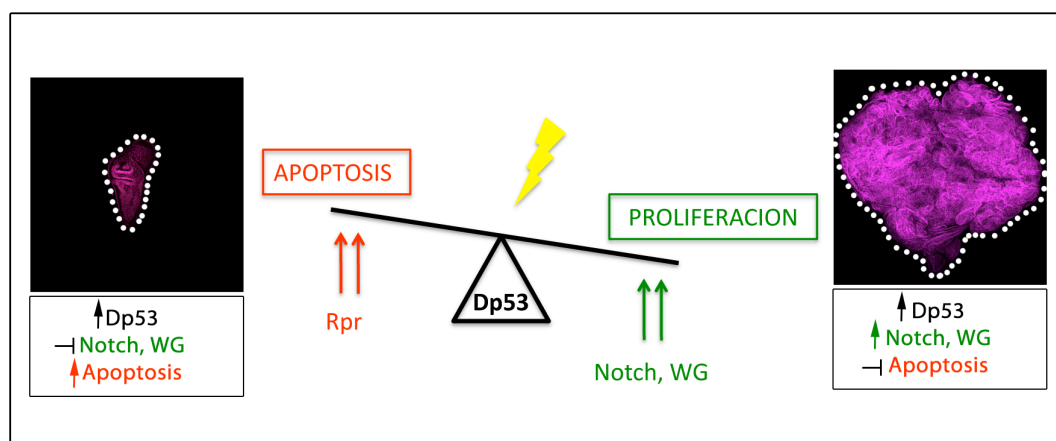
Una de las razones por las que Notch podría estar activándose sería para activar WG, cuya expresión se activa a través de la vía de Notch (Baonza and Garcia-Bellido, 2000; Giraldez and Cohen, 2003; Neumann and Cohen, 1996), actuando como mecanismo de amplificación de la señal proliferativa. Sin embargo, cuando se analizó la expresión de WG en discos *638-GAL4/+; UAS-Dp53/+; UAS-Notch<sup>RNAi</sup>/+* se observó que seguía habiendo altos niveles de expresión de WG, aunque los discos tenían un tamaño más similar al de un disco silvestre (**Figura 35**), luego WG debe ser activado por otro mecanismo, pudiendo ser mediante activación transcripcional a través de Dp53, como sugieren los resultados genéticos (**Figura 29B**) y la presencia de sitios de unión para Dp53 en la secuencia del gen *wg* (**Figura 29A**).

Para analizar la contribución de la activación de Notch a los fenotipos producidos por los altos niveles de Dp53, se estudió cómo afectaba la modulación de los niveles de Notch al fenotipo de las alas *638-GAL4/+; UAS-Dp53/+* aumentando o disminuyendo los niveles de Notch (**Figura 36**) y se observó que en ausencia de *Notch* se hacía más relevante el fenotipo apoptótico (**Figura 36D y H**) y que en presencia de mayores niveles de Notch se hacía más relevante el fenotipo de proliferación (**Figura 36F y L**). Estos resultados sugieren nuevamente que Notch está implicado en la proliferación inducida por los altos niveles de Dp53 y que, por tanto, Dp53 puede controlar el balance entre proliferación y apoptosis en las células, de modo que cuando se elimina o se añade algunos de los factores clave implicados en tales procesos, por ejemplo Notch, el balance se inclina hacia uno u otro lado, es decir, o hay más apoptosis o hay más proliferación.

Por otro lado, se inactivó la apoptosis para estudiar cómo se modulaba el fenotipo de proliferación en condiciones de sobre-expresión de Dp53. Tanto la inactivación de la apoptosis con P35, como con UAS-DIAP1, como con la deficiencia genómica H99, produjeron crecimientos hiperplásicos (**Figuras 38 y 39**). En todos estos sobrecrecimientos se siguieron detectando elevados niveles de expresión de Wingless (**Figura 38E**) y de Notch (**Figura 38F**). En esta ocasión, al eliminar el factor apoptótico, es la proliferación la que se hace más relevante. Además, la inactivación de Notch en discos imaginales de ala de larvas *sd-GAL4/+; UAS-DIAP1/UAS-Dp53; UAS-Notch<sup>RNAi</sup>/+* restauraba parcialmente el tamaño de los discos, es decir, se rescataban los crecimientos,

debido a que se recupera el equilibrio entre proliferación y apoptosis (**Figura 37**). Claramente, cuando se inhibió la apoptosis con UAS-DIAP1 y con la deficiencia H99, en la que se bloquea la cascada apoptótica upstream DRONC, es decir, en estos casos DRONC está inactivo al igual que las caspasas efectoras, también se observaron crecimientos hiperplásicos (**Figura 39**), lo cual no responde a la vía clásica de proliferación inducida por apoptosis dependiente de caspasas. Estos resultados reafirman la hipótesis de que altos niveles de Dp53 inducen proliferación independientemente de la apoptosis.

En conjunto, todos estos resultados, junto con los observados anteriormente, sugieren que altos niveles de DΔNp53 en el disco imaginal de ala promueven apoptosis y proliferación de manera simultánea e independiente. Precisamente esta isoforma ha sido implicada en otros procesos independientemente de su función apoptótica en las células fotorreceptoras del ojo (Fan et al., 2010) (revisado en (Marcel et al., 2009)). La inducción de proliferación en el ala es, al menos parcialmente, debida a la activación transcripcional de *Notch*, y posiblemente también de *wg*. Esto es muy novedoso, puesto que hasta la fecha no se había correlacionado, en *Drosophila*, a Dp53 con Notch a nivel transcripcional, lo cual es apoyado por los resultados observados en humanos (Lefort et al., 2007; Yugawa et al., 2007). Importantly, la inducción de apoptosis y proliferación es el resultado final que se observa, pero que resulta de la ganancia de un proceso frente al otro en cada de una de las células de forma dosis dependiente de Dp53 (**Figura 47**). Estos resultados,



**Figura 47.- Modelo propuesto para explicar el control, mediado por Dp53, del balance homeostático entre proliferación y apoptosis bajo situaciones de estrés celular.** Durante el desarrollo normal, Dp53 “mantiene” la expresión de las proteínas proapoptóticas reaper y de las proteínas Notch y Wingless. En condiciones de estrés celular, los niveles de Dp53 aumentan y activan transcripcionalmente al gen pro-apoptótico *rpr* para promover apoptosis y a los genes *wingless* y *Notch* para promover proliferación. Los distintos niveles celulares de Dp53 hacen que el balance se incline hacia apoptosis o hacia proliferación, ya que si se elimina la apoptosis el balance es favorable a la proliferación mediada por Notch y Wingless (figura derecha); mientras que si se eliminan los factores mitogénicos, Notch o Wingless (figura izquierda) el balance es favorable a la apoptosis.

extrapolándolos a mamíferos, darían una nueva dimensión para la terapia contra el cáncer: altos niveles de p53 producen apoptosis pero también proliferación, lo que puede resultar



contraproducente para el tratamiento. Por tanto, no solo la modulación de los niveles de expresión de p53 son importantes sino también la modulación concomitante de los niveles de Notch para que el balance se incline hacia apoptosis y se evite la proliferación asociada a la misma.

### 5.3.- dRYBP CONTROLA LOS ESTADOS TRANSCRIPCIONALES REPRIMIDOS Y ACTIVADOS A TRAVES DE SU INTERACCION CON PROTEINAS DE LOS GRUPOS PcG Y trxG

Las proteínas PcG/trxG controlan la memoria transcripcional que permite el mantenimiento de los estados transcripcionales reprimidos o activados de los genes a lo largo de la proliferación celular (**Figura 8**). En el genoma de *Drosophila* existen al menos 40 proteínas PcG/trxG diferentes que contienen diversos dominios funcionales y que se agrupan en complejos proteicos multiméricos (**Tablas 1 y 2**). Cada complejo contiene una actividad bioquímica específica asociada a la modificación de histonas, como acetilación, ubiquitinación y metilación (**Figura 8 y Tablas 1 y 2**) (Ringrose and Paro, 2007; Schuettengruber and Cavalli; Schuettengruber et al., 2007; Schuettengruber et al.; Schwartz and Pirrotta, 2008). Además, de las proteínas PcG/trxG que son componentes esenciales de estos complejos, existen otra serie de proteínas a las que se les ha denominado ETPs (Enhancer of Trithorax and Polycomb) (Bejarano and Busturia, 2004; Busturia et al., 2001; Faucheux et al., 2003) y que se asocian tanto a proteínas Polycomb como trithorax, aunque no forman parte de los complejos mayoritarios. Este tipo de proteínas está siendo de gran interés ya que se hipotetiza que son las responsables de proveer dinamismo, plasticidad y especificidad temporal y espacial al sistema de regulación epigenética mediado por las proteínas PcG/trxG. Una de estas proteínas es la proteína dRYBP (Bejarano et al., 2005; Gonzalez et al., 2008), objeto de estudio de esta Tesis.

La proteína dRYBP (*drosophila* Ring and YY1 Binding Protein) es una proteína de 150 aminoácidos (18KDa), que está filogenéticamente conservada (Gonzalez et al., 2008). En su región N-terminal presenta un dominio funcional “Zinc finger” de tipo nucleoporina (NZF, Nucleoporin Zinc Finger) (Gonzalez et al., 2008) y dentro de este dominio presenta una región muy conservada e importante para la ubiquitinación proteica o la interacción con proteínas ubiquitinadas (Arrigoni et al., 2006) (**Figura 9**). Además, estudios recientes muestran que la proteína RYBP de mamíferos es necesaria para el mantenimiento de la ubiquitinación de la histona H2AK119 y que estimula la actividad E3-ligasa de la proteína RING1B (Gao et al., 2012). Sin embargo, en *Drosophila* todavía no se sabe si dRYBP es ubiquitinada o si posee la capacidad de ubiquitinar a otras proteínas.

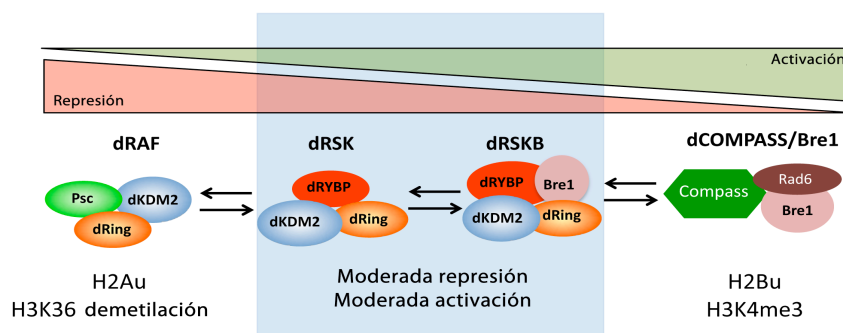
Resultados previos del laboratorio indicaban que la proteína dRYBP interacciona molecular y genéticamente con proteínas de los grupos PcG y trxG (Bejarano et al., 2005; Gonzalez et al., 2008) y una de estas proteínas es la proteína SCE/dRING. Sin embargo, las interacciones moleculares se analizaron en condiciones de sobre-expresión de dRYBP. Para tratar de descifrar la función de la proteína dRYBP en la regulación de la expresión génica en condiciones silvestres se llevó a cabo un análisis de las proteínas que interaccionan con dRYBP mediante análisis por espectrometría de masas a partir de extractos de proteínas nucleares aislados de embriones de *Drosophila*. Este análisis a gran escala reveló que la proteína dRYBP interacciona con una gran diversidad de proteínas involucradas en diversos procesos biológicos (ver **Anexo 6** en el formato digital de la Tesis), lo que podría explicar la pleiotropía de los fenotipos observados tanto en su falta como ganancia de función (Gonzalez et al., 2008; Gonzalez and Busturia, 2009; Aparicio and Busturia, 2013). De entre las proteínas identificadas, se encontraron varias pertenecientes tanto al grupo de proteínas PcG como trxG, entre las que cabe destacar, ya que son objeto de estudio de esta Tesis, las proteínas SCE/dRing, dKdm2 y dBre1 (**Tabla 7**), involucradas en la modificación de histonas.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos mediante el análisis por espectrometría de masas y debido a que, previamente, se había clasificado a la proteína dRYBP como una proteína asociada tanto a proteínas PcG como trxG y, además, interacciona con la proteína PHO, una de las pocas proteínas con capacidad de unirse a secuencias específicas en el ADN (Brown et al., 1998), se propuso que dRYBP pudiera actuar como una proteína reclutadora tanto de las proteínas PcG como trxG, regulando el balance entre la actividad represora mediada por la ubiquitinación de la histona H2A y la actividad activadora mediada por la ubiquitinación de la histona H2B.

El análisis de las interacciones bioquímicas entre la proteína dRYBP y las proteínas SCE/dRing, dKDM2 y dBre1 confirmó que dRYBP interacciona físicamente, en condiciones silvestres, con SCE/dRING, dKdm2 y dBre1 (**Figura 41**). Sin embargo, no interacciona con las proteínas PC y PSC (**Figura 41**), lo que concuerda con los resultados obtenidos mediante la técnica de espectrometría de masas. El hecho de que dRYBP no interaccione con PSC, componente del complejo dRAF (Lagarou et al., 2008), y sí las proteínas SCE/dRING y dKDM2, que también forman parte del complejo dRAF, sugería que la proteína dRYBP pudiera estar formando un complejo alternativo con dRING/SCE y dKDM2 excluyendo a PSC. No obstante, estudios en mamíferos han demostrado que tanto la proteína RYBP como MEL18 (el homólogo a PSC en vertebrados (**Tabla 1**)) interaccionan molecularmente y que, además, son cofactores esenciales para la actividad mono-ubiquitín ligasa de la histona H2A de la proteína SCE/dRING, puesto que la inactivación de ambas

proteínas disminuye drásticamente esta marca de ubiquitinación en la histona H2A (Gao et al., 2012; Tavares et al., 2012). Nuestros resultados indican que es posible que en *Drosophila*, dRYBP y PSC actúen como cofactores de SCE/dRING en complejos independientes, reclutándose al ADN de manera dependiente de contexto y del momento del desarrollo. También se ha demostrado en mamíferos que MEL18 interacciona con CBX7 (el homólogo a PC en vertebrados (**Tabla 1**)) y con RYBP de manera mutuamente excluyente (Tavares et al., 2012), es decir, que RYBP no interacciona con CBX7, lo que concuerda con los resultados obtenidos para dRYBP y PC en *Drosophila* (**Figura 41**), y que a su vez concuerda con los resultados de las interacciones genéticas obtenidos previamente en el laboratorio (Gonzalez et al., 2008).

En cuanto al análisis de las interacciones genéticas entre *dRYBP* y los genes *Sce/dRing*, *dkdm2* y *dBre1*, se obtuvo que *dRYBP* interacciona genéticamente tanto con *Sce/dRing* y *dkdm2* (**Tablas 8 y 9 y Figura 42**), del grupo Polycomb, como con *dBre1* (**Figuras 43 y 44**), del grupo trithorax. Como se ha comentado anteriormente, resultados previos del laboratorio ya mostraron que *dRYBP* interaccionaba genéticamente con genes del grupo trxB, como el gen *trx* (Gonzalez et al., 2008), luego esta nueva interacción entre *dRYBP* y *dBre1* reforzaría la hipótesis de que dRYBP pueda llevar a cabo su función activadora junto con las proteínas trxB controlando los procesos de represión/activación según el contexto y el momento del desarrollo. Sorprendentemente, tanto el análisis de los mutantes *dRYBP<sup>1</sup>/dRYBP<sup>1</sup>*; *dRing<sup>1</sup>/+* como *trxB<sup>E2</sup>/dRing<sup>1</sup>* reveló una función activadora para la proteína dRING/SCE ya que se observaron fenotipos homeóticos típicos de la falta de función de genes trxB, como la despigmentación del A5 (**Tabla 8**). Además, se observó que dRYBP y dKDM2 se suprimen siempre el uno al otro, aliviándose las funciones represoras en unos casos y las activadoras en otros. Esto se observó tanto en el efecto sobre los fenotipos homeóticos (**Tablas 8 y 9**), como sobre los fenotipos en el ala (**Figura 42**), como el efecto sobre el elemento MCP en los discos imaginales (**Figura 45**). En conjunto, estos resultados muestran que ni todas las proteínas son tan represoras ni todas son tan activadoras y que dRYBP puede ser el mediador que, dependiendo del contexto y del momento en el desarrollo, haga que un complejo sea más o menos represor/activador en función de las proteínas que reclute (**Figura 48**). Esto podría explicar cómo se mantienen diferentes niveles de expresión de un gen en células adyacentes formando diferentes dominios o regiones de expresión. Por ejemplo, en el embrión, el gen *Ubx* presenta diferentes niveles de expresión, en el PS4 está totalmente reprimido, en el PS5 presenta niveles intermedios y en el PS6 presenta niveles altos de expresión (Lewis, 1978). Quizás la formación de estos niveles intermedios de activación/represión sean fundamentales para la regulación de los genes homeóticos.



**Figura 48.- Modelo propuesto para explicar el balance entre los estados transcripcionales reprimidos y activados mediado por la proteína dRYBP junto con las proteínas dRING/SCE, dKDM2 y dBRE1. Izquierda:** el complejo dRAF controla que los genes estén fuertemente reprimidos y para ello promueve la Ubiquitinación de la Histona H2A y la demetilación de la histona H3K36. **Derecha:** el complejo dCompass/Bre1 controla que los genes estén fuertemente activados por lo que promueve la Ubiquitinación de la Histona H2B y la trimetilación de la H3K4. La interacción de dRYBP con dKDM2 y Sce impide la interacción de Psc con el complejo dRAF y se forma un complejo RSK que promueve niveles intermedios de represión. Además, la presencia de dBre1 en el complejo dRSKB promueve niveles intermedios de activación.

Resultados previos obtenidos en el laboratorio (Gonzalez et al., 2008), en los que se observó que dRYBP no co-localiza en todos los casos con la marca H3K27me3 en los núcleos de los embriones de *Drosophila* (Gonzalez et al., 2008), reafirmarían esta hipótesis, ya que estos resultados sugieren que los complejos proteicos que contienen dRYBP pueden ser reclutados al ADN independientemente del complejo PRC2, que es el que se encarga de la deposición de esta marca en las histonas para reclutar al complejo PRC1 (**Figura 8**), haciendo que los genes diana a los que se unen dichos complejos formados por dRYBP no sean tan reprimidos. Además, estaría de acuerdo con resultados obtenidos recientemente en vertebrados, en los que los genes diana a los que se unen los complejos que contienen a la proteína RYBP están menos reprimidos que aquellos a los que se unen los complejos PRC2 y PRC1 (Gao et al., 2012; Morey et al., 2012). Es decir, tanto los resultados presentados en *Drosophila* como en vertebrados parecen indicar que la proteína dRYBP actuaría aliviando los estados transcripcionales reprimidos y activados. Los resultados presentados en este trabajo de Tesis sugieren que dRYBP puede llevar a cabo dicha función a través de su interacción con proteínas de los grupos PcG/trxG, promoviendo plasticidad transcripcional.



## CONCLUSIONES

---





Las conclusiones de este Trabajo de Tesis son:

- 1- La modulación de los niveles de expresión de las proteínas de los grupos Polycomb y trithorax afecta a la proliferación y a la muerte celular de los discos imaginales. Proteínas pertenecientes a un mismo complejo proteico tienen diferentes efectos sobre estos procesos.
- 2- Altos niveles de la proteína Polyhomeotic inducen crecimientos hiperplásicos a través de la activación de la vía JAK/STAT, y de los factores Wingless, dMyc y Decapentaplegic, acompañados de una fuerte inducción de apoptosis y débiles cambios en la identidad celular.
- 3- Bajos niveles de la proteína Polyhomeotic inducen crecimientos neoplásicos a través de la activación de la vía JAK/STAT y de los factores Wingless y Decapentaplegic, acompañados de una débil inducción de apoptosis y un fuerte cambio en la identidad celular.
- 4- Tanto bajos como altos niveles de expresión de dRYBP inducen apoptosis dependiente de Dp53.
- 5- El gen *Dp53* interacciona genéticamente con los genes *Notch* y *wingless*.
- 6- La proteína Dp53 regula transcripcionalmente la expresión de *Notch*, en cuyo promotor se localizan sitios de unión para la proteína Dp53.
- 7- Altos niveles de Dp53 producen, además de apoptosis, proliferación en el disco imaginal de ala. Esta proliferación, que podría ser independiente de la apoptosis, requiere la activación de la expresión de Notch y de Wingless.
- 8- El estudio de las proteínas que interaccionan con dRYBP, mediante espectrometría de masas, revela que dRYBP interacciona con una gran variedad de proteínas, entre las que destacan proteínas del grupo Polycomb, proteínas del grupo trithorax y proteínas involucradas en el proceso de ubiquitinación.
- 9- *dRYBP* interacciona genéticamente con *dRing/Sce*, *dkdm2* y *dBre1*. Además, las proteínas dRYBP, dRING/SCE, dKDM2 y dBRE1 interaccionan molecularmente. dRYBP, junto con dRING/SCE y dKDM2, mantienen la represión transcripcional mediada por el elemento MCP, un elemento de respuesta a Polycomb (PRE) del gen *Abdominal-B*.
- 10- dRYBP, dRING/SCE, dKDM2 y dBRE1 están involucrados en el mantenimiento de la expresión de los genes homeóticos promoviendo estados intermedios de represión y activación transcripcionales.



## BIBLIOGRAFÍA

---



- Adachi-Yamada, T., Fujimura-Kamada, K., Nishida, Y. and Matsumoto, K.** (1999). Distortion of proximodistal information causes JNK-dependent apoptosis in *Drosophila* wing. *Nature* **400**, 166-9.
- Affolter, M. and Basler, K.** (2007). The Decapentaplegic morphogen gradient: from pattern formation to growth regulation. *Nat Rev Genet* **8**, 663-74.
- Akam, M., Averof, M., Castelli-Gair, J., Dawes, R., Falciani, F. and Ferrier, D.** (1994). The evolving role of Hox genes in arthropods. *Dev Suppl*, 209-15.
- Alberts, B., Bray, D. Raff, M., Robert, K. and Watson, J. D. .** (2002). Molecular Biology of the Cell. New York, London: Garland Publishing, Inc.
- Aldaz, S., Morata, G. and Azpiazu, N.** (2003). The Pax-homeobox gene *eyegone* is involved in the subdivision of the thorax of *Drosophila*. *Development* **130**, 4473-82.
- Alkema, M. J., Bronk, M., Verhoeven, E., Otte, A., van 't Veer, L. J., Berns, A. and van Lohuizen, M.** (1997). Identification of Bmi1-interacting proteins as constituents of a multimeric mammalian polycomb complex. *Genes Dev* **11**, 226-40.
- Anderson, K. V., Jurgens, G. and Nusslein-Volhard, C.** (1985). Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell* **42**, 779-89.
- Anensen, N., Oyan, A. M., Bourdon, J. C., Kalland, K. H., Bruserud, O. and Gjertsen, B. T.** (2006). A distinct p53 protein isoform signature reflects the onset of induction chemotherapy for acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* **12**, 3985-92.
- Aparicio, R., Neyen, C., Lemaitre, B. and Busturia, A.** (2013). dRYBP Contributes to the Negative Regulation of the *Drosophila* Imd Pathway. *PLoS One* **8**, e62052.
- Arbouzova, N. I. and Zeidler, M. P.** (2006). JAK/STAT signalling in *Drosophila*: insights into conserved regulatory and cellular functions. *Development* **133**, 2605-16.
- Armstrong, J. A., Sperling, A. S., Deuring, R., Manning, L., Moseley, S. L., Papoulas, O., Piatek, C. I., Doe, C. Q. and Tamkun, J. W.** (2005). Genetic screens for enhancers of *brahma* reveal functional interactions between the BRM chromatin-remodeling complex and the delta-notch signal transduction pathway in *Drosophila*. *Genetics* **170**, 1761-74.
- Arrigoni, R., Alam, S. L., Wamstad, J. A., Bardwell, V. J., Sundquist, W. I. and Schreiber-Agus, N.** (2006). The Polycomb-associated protein Rybp is a ubiquitin binding protein. *FEBS Lett* **580**, 6233-41.
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D. and Lake, R. J.** (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* **284**, 770-6.
- Ashburner, M.** (1989). *Drosophila: A Laboratory Handbook*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Bach, E. A., Vincent, S., Zeidler, M. P. and Perrimon, N.** (2003). A sensitized genetic screen to identify novel regulators and components of the *Drosophila* janus kinase/signal transducer and activator of transcription pathway. *Genetics* **165**, 1149-66.
- Bader, M., Arama, E. and Steller, H.** (2010). A novel F-box protein is required for caspase activation during cellular remodeling in *Drosophila*. *Development* **137**, 1679-88.

- Baeg, G. H., Zhou, R. and Perrimon, N.** (2005). Genome-wide RNAi analysis of JAK/STAT signaling components in *Drosophila*. *Genes Dev* **19**, 1861-70.
- Baker, N. E.** (2007). Patterning signals and proliferation in *Drosophila* imaginal discs. *Curr Opin Genet Dev* **17**, 287-93.
- Baonza, A. and Garcia-Bellido, A.** (1999). Dual role of extramacrochaetae in cell proliferation and cell differentiation during wing morphogenesis in *Drosophila*. *Mech Dev* **80**, 133-46.
- Baonza, A. and Garcia-Bellido, A.** (2000). Notch signaling directly controls cell proliferation in the *Drosophila* wing disc. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 2609-14.
- Beck, S., Faradji, F., Brock, H. and Peronnet, F.** (2010). Maintenance of Hox gene expression patterns. *Adv Exp Med Biol* **689**, 41-62.
- Beisel, C., Buness, A., Roustan-Espinosa, I. M., Koch, B., Schmitt, S., Haas, S. A., Hild, M., Katsuyama, T. and Paro, R.** (2007). Comparing active and repressed expression states of genes controlled by the Polycomb/Trithorax group proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 16615-20.
- Bejarano, F. and Busturia, A.** (2004). Function of the Trithorax-like gene during *Drosophila* development. *Dev Biol* **268**, 327-41.
- Bejarano, F., Gonzalez, I., Vidal, M. and Busturia, A.** (2005). The *Drosophila* RYBP gene functions as a Polycomb-dependent transcriptional repressor. *Mech Dev* **122**, 1118-29.
- Beuchle, D., Struhl, G. and Muller, J.** (2001). Polycomb group proteins and heritable silencing of *Drosophila* Hox genes. *Development* **128**, 993-1004.
- Bhaumik, S. R., Smith, E. and Shilatifard, A.** (2007). Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis. *Nat Struct Mol Biol* **14**, 1008-16.
- Blackman, R. K., Sanicola, M., Raftery, L. A., Gillevet, T. and Gelbart, W. M.** (1991). An extensive 3' cis-regulatory region directs the imaginal disk expression of decapentaplegic, a member of the TGF-beta family in *Drosophila*. *Development* **111**, 657-66.
- Blair, S. S., Brower, D. L., Thomas, J. B. and Zavortink, M.** (1994). The role of apterous in the control of dorsoventral compartmentalization and PS integrin gene expression in the developing wing of *Drosophila*. *Development* **120**, 1805-15.
- Bloyer, S., Cavalli, G., Brock, H. W. and Dura, J. M.** (2003). Identification and characterization of polyhomeotic PREs and TREs. *Dev Biol* **261**, 426-42.
- Bocca, S. N., Muzzopappa, M., Silberstein, S. and Wappner, P.** (2001). Occurrence of a putative SCF ubiquitin ligase complex in *Drosophila*. *Biochem Biophys Res Commun* **286**, 357-64.
- Bornemann, D., Miller, E. and Simon, J.** (1996). The *Drosophila* Polycomb group gene Sex comb on midleg (Scm) encodes a zinc finger protein with similarity to polyhomeotic protein. *Development* **122**, 1621-30.

Bourdon, J. C., Fernandes, K., Murray-Zmijewski, F., Liu, G., Diot, A., Xirodimas, D. P., Saville, M. K. and Lane, D. P. (2005). p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes Dev* **19**, 2122-37.

Bourdon, J. C., Khoury, M. P., Diot, A., Baker, L., Fernandes, K., Aoubala, M., Quinlan, P., Purdie, C. A., Jordan, L. B., Prats, A. C. et al. (2011). p53 mutant breast cancer patients expressing p53gamma have as good a prognosis as wild-type p53 breast cancer patients. *Breast Cancer Res* **13**, R7.

Bowman, T., Garcia, R., Turkson, J. and Jove, R. (2000). STATs in oncogenesis. *Oncogene* **19**, 2474-88.

Brand, A. H., Manoukian, A. S. and Perrimon, N. (1994). Ectopic expression in *Drosophila*. *Methods Cell Biol* **44**, 635-54.

Bray, S., Musisi, H. and Bienz, M. (2005). Bre1 is required for Notch signaling and histone modification. *Dev Cell* **8**, 279-86.

Bray, S. J. (2006). Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 678-89.

Breen, T. R., Chinwalla, V. and Harte, P. J. (1995). Trithorax is required to maintain engrailed expression in a subset of engrailed-expressing cells. *Mech Dev* **52**, 89-98.

Breen, T. R. and Duncan, I. M. (1986). Maternal expression of genes that regulate the bithorax complex of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* **118**, 442-56.

Brennecke, J., Hipfner, D. R., Stark, A., Russell, R. B. and Cohen, S. M. (2003). bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in *Drosophila*. *Cell* **113**, 25-36.

Brock, H. W. and Fisher, C. L. (2005). Maintenance of gene expression patterns. *Dev Dyn* **232**, 633-55.

Brodsky, M. H., Nordstrom, W., Tsang, G., Kwan, E., Rubin, G. M. and Abrams, J. M. (2000). *Drosophila* p53 binds a damage response element at the reaper locus. *Cell* **101**, 103-13.

Brodsky, M. H., Weinert, B. T., Tsang, G., Rong, Y. S., McGinnis, N. M., Golic, K. G., Rio, D. C. and Rubin, G. M. (2004). *Drosophila melanogaster* MNK/Chk2 and p53 regulate multiple DNA repair and apoptotic pathways following DNA damage. *Mol Cell Biol* **24**, 1219-31.

Bromberg, J. F., Wrzeszczynska, M. H., Devgan, G., Zhao, Y., Pestell, R. G., Albanese, C. and Darnell, J. E., Jr. (1999). Stat3 as an oncogene. *Cell* **98**, 295-303.

Brower, D. L. (1986). Engrailed gene expression in *Drosophila* imaginal discs. *EMBO J* **5**, 2649-56.

Brown, J. L., Mucci, D., Whiteley, M., Dirksen, M. L. and Kassis, J. A. (1998). The *Drosophila* Polycomb group gene pleiohomeotic encodes a DNA binding protein with homology to the transcription factor YY1. *Mol Cell* **1**, 1057-64.

Brown, S., Hu, N. and Hombria, J. C. (2001). Identification of the first invertebrate interleukin JAK/STAT receptor, the *Drosophila* gene domeless. *Curr Biol* **11**, 1700-5.



- Buchwald, G., van der Stoop, P., Weichenrieder, O., Perrakis, A., van Lohuizen, M. and Sixma, T. K. (2006). Structure and E3-ligase activity of the Ring-Ring complex of polycomb proteins Bmi1 and Ring1b. *EMBO J* **25**, 2465-74.
- Busturia, A. and Bienz, M. (1993). Silencers in abdominal-B, a homeotic *Drosophila* gene. *EMBO J* **12**, 1415-25.
- Busturia, A., Casanova, J., Sanchez-Herrero, E. and Morata, G. (1989). Structure and function of the bithorax complex genes of *Drosophila*. *Ciba Found Symp* **144**, 227-38; discussion 239-42, 290-5.
- Busturia, A., Lloyd, A., Bejarano, F., Zavortink, M., Xin, H. and Sakonju, S. (2001). The MCP silencer of the *Drosophila* Abd-B gene requires both Pleiohomeotic and GAGA factor for the maintenance of repression. *Development* **128**, 2163-73.
- Busturia, A., Wightman, C. D. and Sakonju, S. (1997). A silencer is required for maintenance of transcriptional repression throughout *Drosophila* development. *Development* **124**, 4343-50.
- Cadigan, K. M. (2002). Regulating morphogen gradients in the *Drosophila* wing. *Semin Cell Dev Biol* **13**, 83-90.
- Calleja, M., Moreno, E., Pelaz, S. and Morata, G. (1996). Visualization of gene expression in living adult *Drosophila*. *Science* **274**, 252-5.
- Calo, V., Migliavacca, M., Bazan, V., Macaluso, M., Buscemi, M., Gebbia, N. and Russo, A. (2003). STAT proteins: from normal control of cellular events to tumorigenesis. *J Cell Physiol* **197**, 157-68.
- Cao, R., Tsukada, Y. and Zhang, Y. (2005). Role of Bmi-1 and Ring1A in H2A ubiquitylation and Hox gene silencing. *Mol Cell* **20**, 845-54.
- Cao, R., Wang, L., Wang, H., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Jones, R. S. and Zhang, Y. (2002). Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science* **298**, 1039-43.
- Cao, R. and Zhang, Y. (2004). The functions of E(Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3. *Curr Opin Genet Dev* **14**, 155-64.
- Capdevila, J. and Guerrero, I. (1994). Targeted expression of the signaling molecule decapentaplegic induces pattern duplications and growth alterations in *Drosophila* wings. *EMBO J* **13**, 4459-68.
- Carroll, M., Tomasson, M. H., Barker, G. F., Golub, T. R. and Gilliland, D. G. (1996). The TEL/platelet-derived growth factor beta receptor (PDGF beta R) fusion in chronic myelomonocytic leukemia is a transforming protein that self-associates and activates PDGF beta R kinase-dependent signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 14845-50.
- Celniker, S. E., Keelan, D. J. and Lewis, E. B. (1989). The molecular genetics of the bithorax complex of *Drosophila*: characterization of the products of the Abdominal-B domain. *Genes Dev* **3**, 1424-36.
- Chalkley, G. E. and Verrijzer, C. P. (2004). Immuno-depletion and purification strategies to study chromatin-remodeling factors in vitro. *Methods Enzymol* **377**, 421-42.

- Chanas, G., Lavrov, S., Iral, F., Cavalli, G. and Maschat, F.** (2004). Engrailed and polyhomeotic maintain posterior cell identity through cubitus-interruptus regulation. *Dev Biol* **272**, 522-35.
- Chao, J. L., Tsai, Y. C., Chiu, S. J. and Sun, Y. H.** (2004). Localized Notch signal acts through eyg and upd to promote global growth in *Drosophila* eye. *Development* **131**, 3839-47.
- Chen, D., Zhang, J., Li, M., Rayburn, E. R., Wang, H. and Zhang, R.** (2009). RYBP stabilizes p53 by modulating MDM2. *EMBO Rep* **10**, 166-72.
- Chen, X., Oh, S. W., Zheng, Z., Chen, H. W., Shin, H. H. and Hou, S. X.** (2003). Cyclin D-Cdk4 and cyclin E-Cdk2 regulate the Jak/STAT signal transduction pathway in *Drosophila*. *Dev Cell* **4**, 179-90.
- Chiang, A., O'Connor, M. B., Paro, R., Simon, J. and Bender, W.** (1995). Discrete Polycomb-binding sites in each parasegmental domain of the bithorax complex. *Development* **121**, 1681-9.
- Chitnis, A.** (2006). Why is delta endocytosis required for effective activation of notch? *Dev Dyn* **235**, 886-94.
- Classen, A. K., Bunker, B. D., Harvey, K. F., Vaccari, T. and Bilder, D.** (2009). A tumor suppressor activity of *Drosophila* Polycomb genes mediated by JAK-STAT signaling. *Nat Genet* **41**, 1150-5.
- Clough, E., Moon, W., Wang, S., Smith, K. and Hazelrigg, T.** (2007). Histone methylation is required for oogenesis in *Drosophila*. *Development* **134**, 157-65.
- Cohen, B., McGuffin, M. E., Pfeifle, C., Segal, D. and Cohen, S. M.** (1992). apterous, a gene required for imaginal disc development in *Drosophila* encodes a member of the LIM family of developmental regulatory proteins. *Genes Dev* **6**, 715-29.
- Couso, J. P. and Martinez Arias, A.** (1994). Notch is required for wingless signaling in the epidermis of *Drosophila*. *Cell* **79**, 259-72.
- Curry, C. L., Reed, L. L., Golde, T. E., Miele, L., Nickoloff, B. J. and Foreman, K. E.** (2005). Gamma secretase inhibitor blocks Notch activation and induces apoptosis in Kaposi's sarcoma tumor cells. *Oncogene* **24**, 6333-44.
- Czermin, B., Melfi, R., McCabe, D., Seitz, V., Imhof, A. and Pirrotta, V.** (2002). *Drosophila* enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites. *Cell* **111**, 185-96.
- Danen-Van Oorschot, A. A., Fischer, D. F., Grimbergen, J. M., Klein, B., Zhuang, S., Falkenburg, J. H., Backendorf, C., Quax, P. H., Van der Eb, A. J. and Noteborn, M. H.** (1997). Apoptin induces apoptosis in human transformed and malignant cells but not in normal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 5843-7.
- Danen-van Oorschot, A. A., Voskamp, P., Seelen, M. C., van Miltenburg, M. H., Bolk, M. W., Tait, S. W., Boesen-de Cock, J. G., Rohn, J. L., Borst, J. and Noteborn, M. H.** (2004). Human death effector domain-associated factor interacts with the viral apoptosis agonist Apoptin and exerts tumor-preferential cell killing. *Cell Death Differ* **11**, 564-73.
- de Celis, J. F., Garcia-Bellido, A. and Bray, S. J.** (1996). Activation and function of Notch at the dorsal-ventral boundary of the wing imaginal disc. *Development* **122**, 359-69.

de la Cova, C., Abril, M., Bellosta, P., Gallant, P. and Johnston, L. A. (2004). *Drosophila myc* regulates organ size by inducing cell competition. *Cell* **117**, 107-16.

Dejardin, J., Rappailles, A., Cuvier, O., Grimaud, C., Decoville, M., Locker, D. and Cavalli, G. (2005). Recruitment of *Drosophila* Polycomb group proteins to chromatin by DSP1. *Nature* **434**, 533-8.

Dekanty, A. and Milan, M. (2011). The interplay between morphogens and tissue growth. *EMBO Rep* **12**, 1003-10.

Delanoue, R., Legent, K., Godefroy, N., Flagiello, D., Dutriaux, A., Vaudin, P., Becker, J. L. and Silber, J. (2004). The *Drosophila* wing differentiation factor vestigial-scalloped is required for cell proliferation and cell survival at the dorso-ventral boundary of the wing imaginal disc. *Cell Death Differ* **11**, 110-22.

DeLorenzi, M., Ali, N., Saari, G., Henry, C., Wilcox, M. and Bienz, M. (1988). Evidence that the Abdominal-B r element function is conferred by a trans-regulatory homeoprotein. *EMBO J* **7**, 3223-31.

Diaz-Benjumea, F. J. and Cohen, S. M. (1993). Interaction between dorsal and ventral cells in the imaginal disc directs wing development in *Drosophila*. *Cell* **75**, 741-52.

Dichtel-Danjoy, M. L., Ma, D., Dourlen, P., Chatelain, G., Napoletano, F., Robin, M., Corbet, M., Levet, C., Hafsi, H., Hainaut, P. et al. (2013). *Drosophila* p53 isoforms differentially regulate apoptosis and apoptosis-induced proliferation. *Cell Death Differ* **20**, 108-16.

Dietzl, G., Chen, D., Schnorrer, F., Su, K. C., Barinova, Y., Fellner, M., Gasser, B., Kinsey, K., Oppel, S., Scheiblaue, S. et al. (2007). A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature* **448**, 151-6.

Djiane, A., Krejci, A., Bernard, F., Fexova, S., Millen, K. and Bray, S. J. (2013). Dissecting the mechanisms of Notch induced hyperplasia. *EMBO J* **32**, 60-71.

Donehower, L. A., Harvey, M., Slagle, B. L., McArthur, M. J., Montgomery, C. A., Jr., Butel, J. S. and Bradley, A. (1992). Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* **356**, 215-21.

Dotto, G. P. (2009). Crosstalk of Notch with p53 and p63 in cancer growth control. *Nat Rev Cancer* **9**, 587-95.

Dow, L. E. and Humbert, P. O. (2007). Polarity regulators and the control of epithelial architecture, cell migration, and tumorigenesis. *Int Rev Cytol* **262**, 253-302.

Dukers, D. F., van Galen, J. C., Giroth, C., Jansen, P., Sewalt, R. G., Otte, A. P., Kluin-Nelemans, H. C., Meijer, C. J. and Raaphorst, F. M. (2004). Unique polycomb gene expression pattern in Hodgkin's lymphoma and Hodgkin's lymphoma-derived cell lines. *Am J Pathol* **164**, 873-81.

Duncan, I. (1987). The bithorax complex. *Annu Rev Genet* **21**, 285-319.

Duncan, I. M. (1982). Polycomblike: a gene that appears to be required for the normal expression of the bithorax and antennapedia gene complexes of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **102**, 49-70.

Dura, J. M., Randsholt, N. B., Deatrick, J., Erk, I., Santamaria, P., Freeman, J. D., Freeman, S. J., Weddell, D. and Brock, H. W. (1987). A complex genetic locus, polyhomeotic, is required for segmental specification and epidermal development in *D. melanogaster*. *Cell* **51**, 829-39.

Eilers, M. and Eisenman, R. N. (2008). Myc's broad reach. *Genes Dev* **22**, 2755-66.

el-Deiry, W. S., Kern, S. E., Pietenpol, J. A., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (1992). Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet* **1**, 45-9.

Escudero, L. M., Wei, S. Y., Chiu, W. H., Modolell, J. and Hsu, J. C. (2003). Echinoid synergizes with the Notch signaling pathway in *Drosophila* mesothorax bristle patterning. *Development* **130**, 6305-16.

Espinosa, J. M. (2008). Histone H2B ubiquitination: the cancer connection. *Genes Dev* **22**, 2743-9.

Fan, Y. and Bergmann, A. (2008). Distinct mechanisms of apoptosis-induced compensatory proliferation in proliferating and differentiating tissues in the *Drosophila* eye. *Dev Cell* **14**, 399-410.

Fan, Y., Lee, T. V., Xu, D., Chen, Z., Lamblin, A. F., Steller, H. and Bergmann, A. (2010). Dual roles of *Drosophila* p53 in cell death and cell differentiation. *Cell Death Differ* **17**, 912-21.

Faucheux, M., Roignant, J. Y., Netter, S., Charollais, J., Antoniewski, C. and Theodore, L. (2003). batman Interacts with polycomb and trithorax group genes and encodes a BTB/POZ protein that is included in a complex containing GAGA factor. *Mol Cell Biol* **23**, 1181-95.

Feinberg, A. P. and Tycko, B. (2004). The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer* **4**, 143-53.

Ferres-Marco, D., Gutierrez-Garcia, I., Vallejo, D. M., Bolivar, J., Gutierrez-Avino, F. J. and Dominguez, M. (2006). Epigenetic silencers and Notch collaborate to promote malignant tumours by Rb silencing. *Nature* **439**, 430-6.

Fischle, W., Wang, Y., Jacobs, S. A., Kim, Y., Allis, C. D. and Khorasanizadeh, S. (2003). Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains. *Genes Dev* **17**, 1870-81.

Flaus, A. and Owen-Hughes, T. (2001). Mechanisms for ATP-dependent chromatin remodelling. *Curr Opin Genet Dev* **11**, 148-54.

Folberg-Blum, A., Sapir, A., Shilo, B. Z. and Oren, M. (2002). Overexpression of mouse Mdm2 induces developmental phenotypes in *Drosophila*. *Oncogene* **21**, 2413-7.

Franke, A., DeCamillis, M., Zink, D., Cheng, N., Brock, H. W. and Paro, R. (1992). Polycomb and polyhomeotic are constituents of a multimeric protein complex in chromatin of *Drosophila melanogaster*. *EMBO J* **11**, 2941-50.

Freie, B. W. and Eisenman, R. N. (2008). Ratcheting Myc. *Cancer Cell* **14**, 425-6.

Fritsch, C., Brown, J. L., Kassis, J. A. and Muller, J. (1999). The DNA-binding polycomb group protein pleiohomeotic mediates silencing of a *Drosophila* homeotic gene. *Development* **126**, 3905-13.

**Fuchs, Y. and Steller, H.** (2011). Programmed cell death in animal development and disease. *Cell* **147**, 742-58.

**Fullgrabe, J., Hajji, N. and Joseph, B.** (2010). Cracking the death code: apoptosis-related histone modifications. *Cell Death Differ* **17**, 1238-43.

**Galliot, B. and Chera, S.** (2010). The Hydra model: disclosing an apoptosis-driven generator of Wnt-based regeneration. *Trends Cell Biol* **20**, 514-23.

**Gambetta, M. C., Oktaba, K. and Muller, J.** (2009). Essential role of the glycosyltransferase *sxc/Ogt* in polycomb repression. *Science* **325**, 93-6.

**Gao, Z., Zhang, J., Bonasio, R., Strino, F., Sawai, A., Parisi, F., Kluger, Y. and Reinberg, D.** (2012). PCGF homologs, CBX proteins, and RYBP define functionally distinct PRC1 family complexes. *Mol Cell* **45**, 344-56.

**Garcia, E., Marcos-Gutierrez, C., del Mar Lorente, M., Moreno, J. C. and Vidal, M.** (1999). RYBP, a new repressor protein that interacts with components of the mammalian Polycomb complex, and with the transcription factor YY1. *EMBO J* **18**, 3404-18.

**Garcia-Bellido, A. and Merriam, J. R.** (1971). Parameters of the wing imaginal disc development of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* **24**, 61-87.

**Gerhart, J.** (1999). 1998 Warkany lecture: signaling pathways in development. *Teratology* **60**, 226-39.

**Giraldez, A. J. and Cohen, S. M.** (2003). Wingless and Notch signaling provide cell survival cues and control cell proliferation during wing development. *Development* **130**, 6533-43.

**Go, M. J., Eastman, D. S. and Artavanis-Tsakonas, S.** (1998). Cell proliferation control by Notch signaling in *Drosophila* development. *Development* **125**, 2031-40.

**Golic, K. G. and Lindquist, S.** (1989). The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the *Drosophila* genome. *Cell* **59**, 499-509.

**Gonzalez, I., Aparicio, R. and Busturia, A.** (2008). Functional characterization of the dRYBP gene in *Drosophila*. *Genetics* **179**, 1373-88.

**Gonzalez, I. and Busturia, A.** (2009). High levels of dRYBP induce apoptosis in *Drosophila* imaginal cells through the activation of reaper and the requirement of trithorax, dredd and dFADD. *Cell Res* **19**, 747-57.

**Gonzalez-Reyes, A., Urquia, N., Gehring, W. J., Struhl, G. and Morata, G.** (1990). Are cross-regulatory interactions between homoeotic genes functionally significant? *Nature* **344**, 78-80.

**Gorfinkiel, N., Fanti, L., Melgar, T., Garcia, E., Pimpinelli, S., Guerrero, I. and Vidal, M.** (2004). The *Drosophila* Polycomb group gene *Sex combs extra* encodes the ortholog of mammalian Ring1 proteins. *Mech Dev* **121**, 449-62.

**Gould, A. P., Brookman, J. J., Strutt, D. I. and White, R. A.** (1990). Targets of homeotic gene control in *Drosophila*. *Nature* **348**, 308-12.

**Green, D. R. and Kroemer, G.** (2009). Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature* **458**, 1127-30.

**Greenwald, I.** (1998). LIN-12/Notch signaling: lessons from worms and flies. *Genes Dev* **12**, 1751-62.

**Guicciardi, M. E. and Gores, G. J.** (2009). Life and death by death receptors. *FASEB J* **23**, 1625-37.

**Gullaud, M., Delanoue, R. and Silber, J.** (2003). A Drosophila model to study the functions of TWIST orthologs in apoptosis and proliferation. *Cell Death Differ* **10**, 641-51.

**Gunster, M. J., Satijn, D. P., Hamer, K. M., den Blaauwen, J. L., de Bruijn, D., Alkema, M. J., van Lohuizen, M., van Driel, R. and Otte, A. P.** (1997). Identification and characterization of interactions between the vertebrate polycomb-group protein BMI1 and human homologs of polyhomeotic. *Mol Cell Biol* **17**, 2326-35.

**Gutierrez, L., Oktaba, K., Scheuermann, J. C., Gambetta, M. C., Ly-Hartig, N. and Muller, J.** (2012). The role of the histone H2A ubiquitinase Sce in Polycomb repression. *Development* **139**, 117-27.

**Haines, N. and Irvine, K. D.** (2003). Glycosylation regulates Notch signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 786-97.

**Hanratty, W. P. and Dearolf, C. R.** (1993). The Drosophila Tumorous-lethal hematopoietic oncogene is a dominant mutation in the hopscotch locus. *Mol Gen Genet* **238**, 33-7.

**Hariharan, I. K. and Bilder, D.** (2006). Regulation of imaginal disc growth by tumor-suppressor genes in Drosophila. *Annu Rev Genet* **40**, 335-61.

**Hartenstein, A. Y., Rugendorff, A., Tepass, U. and Hartenstein, V.** (1992). The function of the neurogenic genes during epithelial development in the Drosophila embryo. *Development* **116**, 1203-20.

**Haruki, N., Kawaguchi, K. S., Eichenberger, S., Massion, P. P., Olson, S., Gonzalez, A., Carbone, D. P. and Dang, T. P.** (2005). Dominant-negative Notch3 receptor inhibits mitogen-activated protein kinase pathway and the growth of human lung cancers. *Cancer Res* **65**, 3555-61.

**Hay, B. A., Wolff, T. and Rubin, G. M.** (1994). Expression of baculovirus P35 prevents cell death in Drosophila. *Development* **120**, 2121-9.

**Henry, K. W., Wyce, A., Lo, W. S., Duggan, L. J., Emre, N. C., Kao, C. F., Pillus, L., Shilatifard, A., Osley, M. A. and Berger, S. L.** (2003). Transcriptional activation via sequential histone H2B ubiquitylation and deubiquitylation, mediated by SAGA-associated Ubp8. *Genes Dev* **17**, 2648-63.

**Herranz, H., Hong, X., Hung, N. T., Voorhoeve, P. M. and Cohen, S. M.** (2012). Oncogenic cooperation between SOCS family proteins and EGFR identified using a Drosophila epithelial transformation model. *Genes Dev* **26**, 1602-11.

**Herranz, H. and Milan, M.** (2008). Signalling molecules, growth regulators and cell cycle control in Drosophila. *Cell Cycle* **7**, 3335-7.



**Herzog, G., Joerger, A. C., Shmueli, M. D., Fersht, A. R., Gazit, E. and Segal, D. (2012).** Evaluating *Drosophila* p53 as a model system for studying cancer mutations. *J Biol Chem* **287**, 44330-7.

**Hidalgo, A. (1994).** Three distinct roles for the engrailed gene in *Drosophila* wing development. *Curr Biol* **4**, 1087-98.

**Hofstetter, G., Berger, A., Fiegl, H., Slade, N., Zoric, A., Holzer, B., Schuster, E., Mobus, V. J., Reimer, D., Daxenbichler, G. et al. (2010).** Alternative splicing of p53 and p73: the novel p53 splice variant p53delta is an independent prognostic marker in ovarian cancer. *Oncogene* **29**, 1997-2004.

**Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. and Harris, C. C. (1991).** p53 mutations in human cancers. *Science* **253**, 49-53.

**Hombria, J. C. and Brown, S. (2002).** The fertile field of *Drosophila* Jak/STAT signalling. *Curr Biol* **12**, R569-75.

**Horard, B., Tatout, C., Poux, S. and Pirrotta, V. (2000).** Structure of a polycomb response element and in vitro binding of polycomb group complexes containing GAGA factor. *Mol Cell Biol* **20**, 3187-97.

**Hou, S. X., Zheng, Z., Chen, X. and Perrimon, N. (2002).** The Jak/STAT pathway in model organisms: emerging roles in cell movement. *Dev Cell* **3**, 765-78.

**Housden, B. E., Millen, K. and Bray, S. J. (2012).** *Drosophila* Reporter Vectors Compatible with PhiC31 Integrase Transgenesis Techniques and Their Use to Generate New Notch Reporter Fly Lines. *G3 (Bethesda)* **2**, 79-82.

**Hu, W., Feng, Z. and Levine, A. J. (2012).** The Regulation of Multiple p53 Stress Responses is Mediated through MDM2. *Genes Cancer* **3**, 199-208.

**Huh, J. R., Guo, M. and Hay, B. A. (2004).** Compensatory proliferation induced by cell death in the *Drosophila* wing disc requires activity of the apical cell death caspase Dronc in a nonapoptotic role. *Curr Biol* **14**, 1262-6.

**Hwang, W. W., Venkatasubrahmanyam, S., Ianculescu, A. G., Tong, A., Boone, C. and Madhani, H. D. (2003).** A conserved RING finger protein required for histone H2B monoubiquitination and cell size control. *Mol Cell* **11**, 261-6.

**Igaki, T. (2009).** Correcting developmental errors by apoptosis: lessons from *Drosophila* JNK signaling. *Apoptosis* **14**, 1021-8.

**Isono, K., Fujimura, Y., Shinga, J., Yamaki, M., J, O. W., Takiyama, Y., Murahashi, Y., Takada, Y., Mizutani-Koseki, Y. and Koseki, H. (2005).** Mammalian polyhomeotic homologues Phc2 and Phc1 act in synergy to mediate polycomb repression of Hox genes. *Mol Cell Biol* **25**, 6694-706.

**Ito, K., Awano, W., Suzuki, K., Hiromi, Y. and Yamamoto, D. (1997).** The *Drosophila* mushroom body is a quadruple structure of clonal units each of which contains a virtually identical set of neurones and glial cells. *Development* **124**, 761-71.

**Jackle, H., Hoch, M., Pankratz, M. J., Gerwin, N., Sauer, F. and Bronner, G. (1992).** Transcriptional control by *Drosophila* gap genes. *J Cell Sci Suppl* **16**, 39-51.



- Jaklevic, B. R. and Su, T. T.** (2004). Relative contribution of DNA repair, cell cycle checkpoints, and cell death to survival after DNA damage in *Drosophila* larvae. *Curr Biol* **14**, 23-32.
- Januschke, J. and Gonzalez, C.** (2008). *Drosophila* asymmetric division, polarity and cancer. *Oncogene* **27**, 6994-7002.
- Jekely, G. and Rorth, P.** (2003). Hrs mediates downregulation of multiple signalling receptors in *Drosophila*. *EMBO Rep* **4**, 1163-8.
- Jenuwein, T. and Allis, C. D.** (2001). Translating the histone code. *Science* **293**, 1074-80.
- Jiang, C., Lamblin, A. F., Steller, H. and Thummel, C. S.** (2000). A steroid-triggered transcriptional hierarchy controls salivary gland cell death during *Drosophila* metamorphosis. *Mol Cell* **5**, 445-55.
- Jin, S., Martinek, S., Joo, W. S., Wortman, J. R., Mirkovic, N., Sali, A., Yandell, M. D., Pavletich, N. P., Young, M. W. and Levine, A. J.** (2000). Identification and characterization of a p53 homologue in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7301-6.
- Jurgens, G.** (1985). A group of genes controlling the spatial expression of the bithorax complex in *Drosophila*. *Nature* **316**, 153-155.
- Kal, A. J., Mahmoudi, T., Zak, N. B. and Verrijzer, C. P.** (2000). The *Drosophila* brahma complex is an essential coactivator for the trithorax group protein zeste. *Genes Dev* **14**, 1058-71.
- Kamakaka, R. T., Tyree, C. M. and Kadonaga, J. T.** (1991). Accurate and efficient RNA polymerase II transcription with a soluble nuclear fraction derived from *Drosophila* embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 1024-8.
- Kanda, H. and Miura, M.** (2004). Regulatory roles of JNK in programmed cell death. *J Biochem* **136**, 1-6.
- Karch, F., Bender, W. and Weiffenbach, B.** (1990). abdA expression in *Drosophila* embryos. *Genes Dev* **4**, 1573-87.
- Kauffman, S. A.** (1981). Patterns of temperature sensitivity in Contrabithorax/Ultrabithorax heterozygotes of *Drosophila*. *Dev Biol* **88**, 341-51.
- Kaufman, T. C., Seeger, M. A. and Olsen, G.** (1990). Molecular and genetic organization of the antennapedia gene complex of *Drosophila melanogaster*. *Adv Genet* **27**, 309-62.
- Kennison, J. A. and Tamkun, J. W.** (1988). Dosage-dependent modifiers of polycomb and antennapedia mutations in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 8136-40.
- Kettunen, E., el-Rifai, W., Bjorkqvist, A. M., Wolff, H., Karjalainen, A., Anttila, S., Mattson, K., Husgafvel-Pursiainen, K. and Knuutila, S.** (2000). A broad amplification pattern at 3q in squamous cell lung cancer—a fluorescence in situ hybridization study. *Cancer Genet Cytogenet* **117**, 66-70.
- Khavari, P. A., Peterson, C. L., Tamkun, J. W., Mendel, D. B. and Crabtree, G. R.** (1993). BRG1 contains a conserved domain of the SWI2/SNF2 family necessary for normal mitotic growth and transcription. *Nature* **366**, 170-4.

- Kidd, S., Lockett, T. J. and Young, M. W. (1983). The Notch locus of *Drosophila melanogaster*. *Cell* **34**, 421-33.
- Kidder, B. L., Yang, J. and Palmer, S. (2008). Stat3 and c-Myc genome-wide promoter occupancy in embryonic stem cells. *PLoS ONE* **3**, e3932.
- Kiefer, J. C. (2007). Epigenetics in development. *Dev Dyn* **236**, 1144-56.
- Kile, B. T. and Alexander, W. S. (2001). The suppressors of cytokine signalling (SOCS). *Cell Mol Life Sci* **58**, 1627-35.
- Kim, C. A., Gingery, M., Pilpa, R. M. and Bowie, J. U. (2002). The SAM domain of polyhomeotic forms a helical polymer. *Nat Struct Biol* **9**, 453-7.
- Kingston, R. E. and Narlikar, G. J. (1999). ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. *Genes Dev* **13**, 2339-52.
- Kiuchi, N., Nakajima, K., Ichiba, M., Fukada, T., Narimatsu, M., Mizuno, K., Hibi, M. and Hirano, T. (1999). STAT3 is required for the gp130-mediated full activation of the c-myc gene. *J Exp Med* **189**, 63-73.
- Klose, R. J., Kallin, E. M. and Zhang, Y. (2006). JmjC-domain-containing proteins and histone demethylation. *Nat Rev Genet* **7**, 715-27.
- Klymenko, T., Papp, B., Fischle, W., Kocher, T., Schelder, M., Fritsch, C., Wild, B., Wilm, M. and Muller, J. (2006). A Polycomb group protein complex with sequence-specific DNA-binding and selective methyl-lysine-binding activities. *Genes Dev* **20**, 1110-22.
- Kohler, C. and Villar, C. B. (2008). Programming of gene expression by Polycomb group proteins. *Trends Cell Biol* **18**, 236-43.
- Kornfeld, K., Saint, R. B., Beachy, P. A., Harte, P. J., Peattie, D. A. and Hogness, D. S. (1989). Structure and expression of a family of Ultrabithorax mRNAs generated by alternative splicing and polyadenylation in *Drosophila*. *Genes Dev* **3**, 243-58.
- Kramatschek, B. and Campos-Ortega, J. A. (1994). Neuroectodermal transcription of the *Drosophila* neurogenic genes *E(spl)* and *HLH-m5* is regulated by proneural genes. *Development* **120**, 815-26.
- Krumlauf, R. (1994). Hox genes in vertebrate development. *Cell* **78**, 191-201.
- Kruse, J. P. and Gu, W. (2009a). Modes of p53 regulation. *Cell* **137**, 609-22.
- Kruse, J. P. and Gu, W. (2009b). MSL2 promotes Mdm2-independent cytoplasmic localization of p53. *J Biol Chem* **284**, 3250-63.
- Kurucz, E., Zettervall, C. J., Sinka, R., Vilmos, P., Pivarcsi, A., Ekengren, S., Hegedus, Z., Ando, I. and Hultmark, D. (2003). Hemese, a hemocyte-specific transmembrane protein, affects the cellular immune response in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2622-7.
- Kuzmichev, A., Nishioka, K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Reinberg, D. (2002). Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the Enhancer of Zeste protein. *Genes Dev* **16**, 2893-905.

**Kwong, C., Adryan, B., Bell, I., Meadows, L., Russell, S., Manak, J. R. and White, R.** (2008). Stability and dynamics of polycomb target sites in *Drosophila* development. *PLoS Genet* **4**, e1000178.

**Lagarou, A., Mohd-Sarip, A., Moshkin, Y. M., Chalkley, G. E., Bezstarosti, K., Demmers, J. A. and Verrijzer, C. P.** (2008). dKDM2 couples histone H2A ubiquitylation to histone H3 demethylation during Polycomb group silencing. *Genes Dev* **22**, 2799-810.

**Lai, E. C.** (2002). Protein degradation: four E3s for the notch pathway. *Curr Biol* **12**, R74-8.

**Lai, E. C.** (2004). Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development* **131**, 965-73.

**Lawrence, P.** (1992). The Making of a fly. The genetics of Animal Design. *Oxford Blackwell Scientific Publications*.

**Le Borgne, R., Remaud, S., Hamel, S. and Schweisguth, F.** (2005). Two distinct E3 ubiquitin ligases have complementary functions in the regulation of delta and serrate signaling in *Drosophila*. *PLoS Biol* **3**, e96.

**Lechtenberg, B. C., Allen, M. D., Rutherford, T. J., Freund, S. M. and Bycroft, M.** (2009). Solution structure of the FCS zinc finger domain of the human polycomb group protein L(3)mbt-like 2. *Protein Sci* **18**, 657-61.

**Lecuit, T., Brook, W. J., Ng, M., Calleja, M., Sun, H. and Cohen, S. M.** (1996). Two distinct mechanisms for long-range patterning by Decapentaplegic in the *Drosophila* wing. *Nature* **381**, 387-93.

**Lee, J. H., Lee, E., Park, J., Kim, E., Kim, J. and Chung, J.** (2003). In vivo p53 function is indispensable for DNA damage-induced apoptotic signaling in *Drosophila*. *FEBS Lett* **550**, 5-10.

**Lee, N., Maurange, C., Ringrose, L. and Paro, R.** (2005). Suppression of Polycomb group proteins by JNK signalling induces transdetermination in *Drosophila* imaginal discs. *Nature* **438**, 234-7.

**Lefort, K., Mandinova, A., Ostano, P., Kolev, V., Calpini, V., Kolfschoten, I., Devgan, V., Lieb, J., Raffoul, W., Hohl, D. et al.** (2007). Notch1 is a p53 target gene involved in human keratinocyte tumor suppression through negative regulation of ROCK1/2 and MRCKalpha kinases. *Genes Dev* **21**, 562-77.

**Levine, S. S., Weiss, A., Erdjument-Bromage, H., Shao, Z., Tempst, P. and Kingston, R. E.** (2002). The core of the polycomb repressive complex is compositionally and functionally conserved in flies and humans. *Mol Cell Biol* **22**, 6070-8.

**Lewis, E. B.** (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* **276**, 565-70.

**Livak, K. J. and Schmittgen, T. D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-8.

- Lo, S. M., Ahuja, N. K. and Francis, N. J.** (2009). Polycomb group protein Suppressor 2 of zeste is a functional homolog of Posterior Sex Combs. *Mol Cell Biol* **29**, 515-25.
- Lohmann, I., McGinnis, N., Bodmer, M. and McGinnis, W.** (2002). The Drosophila Hox gene deformed sculpts head morphology via direct regulation of the apoptosis activator reaper. *Cell* **110**, 457-66.
- Lopez-Onieva, L., Fernandez-Minan, A. and Gonzalez-Reyes, A.** (2008). Jak/Stat signalling in niche support cells regulates dpp transcription to control germline stem cell maintenance in the Drosophila ovary. *Development* **135**, 533-40.
- Love, I. M. and Grossman, S. R.** (2012). It Takes 15 to Tango: Making Sense of the Many Ubiquitin Ligases of p53. *Genes Cancer* **3**, 249-63.
- Lu, H. and Bilder, D.** (2005). Endocytic control of epithelial polarity and proliferation in Drosophila. *Nat Cell Biol* **7**, 1232-9.
- Lue, N. F., Chasman, D. I., Buchman, A. R. and Kornberg, R. D.** (1987). Interaction of GAL4 and GAL80 gene regulatory proteins in vitro. *Mol Cell Biol* **7**, 3446-51.
- Lund, A. H. and van Lohuizen, M.** (2004). Epigenetics and cancer. *Genes Dev* **18**, 2315-35.
- Luscher, B. and Eisenman, R. N.** (1990a). New light on Myc and Myb. Part I. Myc. *Genes Dev* **4**, 2025-35.
- Luscher, B. and Eisenman, R. N.** (1990b). New light on Myc and Myb. Part II. Myb. *Genes Dev* **4**, 2235-41.
- Maeda, R. K. and Karch, F.** (2010). Cis-regulation in the Drosophila Bithorax Complex. *Adv Exp Med Biol* **689**, 17-40.
- Marcel, V., Dichtel-Danjoy, M. L., Sagne, C., Hafsi, H., Ma, D., Ortiz-Cuaran, S., Olivier, M., Hall, J., Mollereau, B., Hainaut, P. et al.** (2011). Biological functions of p53 isoforms through evolution: lessons from animal and cellular models. *Cell Death Differ* **18**, 1815-24.
- Marcel, V., Palmero, E. I., Falagan-Lotsch, P., Martel-Planche, G., Ashton-Prolla, P., Olivier, M., Brentani, R. R., Hainaut, P. and Achatz, M. I.** (2009). TP53 PIN3 and MDM2 SNP309 polymorphisms as genetic modifiers in the Li-Fraumeni syndrome: impact on age at first diagnosis. *J Med Genet* **46**, 766-72.
- Martin-Blanco, E., Gampel, A., Ring, J., Virdee, K., Kirov, N., Tolkovsky, A. M. and Martinez-Arias, A.** (1998). puckered encodes a phosphatase that mediates a feedback loop regulating JNK activity during dorsal closure in Drosophila. *Genes Dev* **12**, 557-70.
- Martinez, A. M. and Cavalli, G.** (2006). The role of polycomb group proteins in cell cycle regulation during development. *Cell Cycle* **5**, 1189-97.
- Martinez, A. M., Schuettengruber, B., Sakr, S., Janic, A., Gonzalez, C. and Cavalli, G.** (2009). Polyhomeotic has a tumor suppressor activity mediated by repression of Notch signaling. *Nat Genet* **41**, 1076-82.

- Martinez-Arias, A. and Lawrence, P. A.** (1985). Parasegments and compartments in the *Drosophila* embryo. *Nature* **313**, 639-42.
- McEwen, D. G. and Peifer, M.** (2005). Puckered, a *Drosophila* MAPK phosphatase, ensures cell viability by antagonizing JNK-induced apoptosis. *Development* **132**, 3935-46.
- McGuire, S. E., Le, P. T., Osborn, A. J., Matsumoto, K. and Davis, R. L.** (2003). Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila*. *Science* **302**, 1765-8.
- Menut, L., Vaccari, T., Dionne, H., Hill, J., Wu, G. and Bilder, D.** (2007). A mosaic genetic screen for *Drosophila* neoplastic tumor suppressor genes based on defective pupation. *Genetics* **177**, 1667-77.
- Micchelli, C. A., Rulifson, E. J. and Blair, S. S.** (1997). The function and regulation of cut expression on the wing margin of *Drosophila*: Notch, Wingless and a dominant negative role for Delta and Serrate. *Development* **124**, 1485-95.
- Mills, A. A.** (2010). Throwing the cancer switch: reciprocal roles of polycomb and trithorax proteins. *Nat Rev Cancer* **10**, 669-82.
- Minakhina, S. and Steward, R.** (2006). Melanotic mutants in *Drosophila*: pathways and phenotypes. *Genetics* **174**, 253-63.
- Mishra, R. K., Mihaly, J., Barges, S., Spierer, A., Karch, F., Hagstrom, K., Schweinsberg, S. E. and Schedl, P.** (2001). The *iab-7* polycomb response element maps to a nucleosome-free region of chromatin and requires both GAGA and pleiohomeotic for silencing activity. *Mol Cell Biol* **21**, 1311-8.
- Mohan, M., Herz, H. M., Smith, E. R., Zhang, Y., Jackson, J., Washburn, M. P., Florens, L., Eissenberg, J. C. and Shilatifard, A.** (2011). The COMPASS family of H3K4 methylases in *Drosophila*. *Mol Cell Biol* **31**, 4310-8.
- Mohd-Sarip, A., Venturini, F., Chalkley, G. E. and Verrijzer, C. P.** (2002). Pleiohomeotic can link polycomb to DNA and mediate transcriptional repression. *Mol Cell Biol* **22**, 7473-83.
- Mohr, O. L.** (1919). Character Changes Caused by Mutation of an Entire Region of a Chromosome in *Drosophila*. *Genetics* **4**, 275-82.
- Mollereau, B., Perez-Garijo, A., Bergmann, A., Miura, M., Gerlitz, O., Ryoo, H. D., Steller, H. and Morata, G.** (2012). Compensatory proliferation and apoptosis-induced proliferation: a need for clarification. *Cell Death Differ* **20**, 181.
- Morel, V., Lecourtois, M., Massiani, O., Maier, D., Preiss, A. and Schweisguth, F.** (2001). Transcriptional repression by suppressor of hairless involves the binding of a hairless-dCtBP complex in *Drosophila*. *Curr Biol* **11**, 789-92.
- Moreno, E. and Basler, K.** (2004). dMyc transforms cells into super-competitors. *Cell* **117**, 117-29.
- Moreno, E. and Morata, G.** (1999). Caudal is the Hox gene that specifies the most posterior *Drosophila* segment. *Nature* **400**, 873-7.
- Morey, L., Aloia, L., Cozzuto, L., Benitah, S. A. and Di Croce, L.** (2012). RYBP and Cbx7 define specific biological functions of polycomb complexes in mouse embryonic stem cells. *Cell Rep* **3**, 60-9.

- Muchardt, C. and Yaniv, M.** (1993). A human homologue of *Saccharomyces cerevisiae* SNF2/SWI2 and *Drosophila* brm genes potentiates transcriptional activation by the glucocorticoid receptor. *EMBO J* **12**, 4279-90.
- Mukherjee, T., Hombria, J. C. and Zeidler, M. P.** (2005). Opposing roles for *Drosophila* JAK/STAT signalling during cellular proliferation. *Oncogene* **24**, 2503-11.
- Mukherjee, T., Schafer, U. and Zeidler, M. P.** (2006). Identification of *Drosophila* genes modulating Janus kinase/signal transducer and activator of transcription signal transduction. *Genetics* **172**, 1683-97.
- Mulholland, N. M., King, I. F. and Kingston, R. E.** (2003). Regulation of Polycomb group complexes by the sequence-specific DNA binding proteins Zeste and GAGA. *Genes Dev* **17**, 2741-6.
- Muller, D., Kugler, S. J., Preiss, A., Maier, D. and Nagel, A. C.** (2005a). Genetic modifier screens on Hairless gain-of-function phenotypes reveal genes involved in cell differentiation, cell growth and apoptosis in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **171**, 1137-52.
- Muller, J., Hart, C. M., Francis, N. J., Vargas, M. L., Sengupta, A., Wild, B., Miller, E. L., O'Connor, M. B., Kingston, R. E. and Simon, J. A.** (2002). Histone methyltransferase activity of a *Drosophila* Polycomb group repressor complex. *Cell* **111**, 197-208.
- Muller, J. and Kassis, J. A.** (2006). Polycomb response elements and targeting of Polycomb group proteins in *Drosophila*. *Curr Opin Genet Dev* **16**, 476-84.
- Muller, J. and Verrijzer, P.** (2009). Biochemical mechanisms of gene regulation by polycomb group protein complexes. *Curr Opin Genet Dev* **19**, 150-8.
- Muller, P., Kutteneuler, D., Gesellchen, V., Zeidler, M. P. and Boutros, M.** (2005b). Identification of JAK/STAT signalling components by genome-wide RNA interference. *Nature* **436**, 871-5.
- Nakao, K. and Campos-Ortega, J. A.** (1996). Persistent expression of genes of the enhancer of split complex suppresses neural development in *Drosophila*. *Neuron* **16**, 275-86.
- Negre, N. and Cavalli, G.** (2006). [Polycomb controls the cell fate]. *Med Sci (Paris)* **22**, 1033-5.
- Negre, N., Hennetin, J., Sun, L. V., Lavrov, S., Bellis, M., White, K. P. and Cavalli, G.** (2006). Chromosomal distribution of PcG proteins during *Drosophila* development. *PLoS Biol* **4**, e170.
- Nellen, D., Burke, R., Struhl, G. and Basler, K.** (1996). Direct and long-range action of a DPP morphogen gradient. *Cell* **85**, 357-68.
- Netter, S., Faucheux, M. and Theodore, L.** (2001). Developmental dynamics of a polyhomeotic-EGFP fusion in vivo. *DNA Cell Biol* **20**, 483-92.
- Neumann, C. J. and Cohen, S. M.** (1996). A hierarchy of cross-regulation involving Notch, wingless, vestigial and cut organizes the dorsal/ventral axis of the *Drosophila* wing. *Development* **122**, 3477-85.



**Neumann, C. J. and Cohen, S. M.** (1997). Long-range action of Wingless organizes the dorsal-ventral axis of the *Drosophila* wing. *Development* **124**, 871-80.

**Ng, M., Diaz-Benjumea, F. J., Vincent, J. P., Wu, J. and Cohen, S. M.** (1996). Specification of the wing by localized expression of wingless protein. *Nature* **381**, 316-8.

**Nicholson, D. W., Ali, A., Thornberry, N. A., Vaillancourt, J. P., Ding, C. K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P. R., Labelle, M., Lazebnik, Y. A. et al.** (1995). Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* **376**, 37-43.

**Nomura, M., Takiyama, Y. and Shimada, K.** (1994). Isolation and characterization of retinoic acid-inducible cDNA clones in F9 cells: one of the early inducible clones encodes a novel protein sharing several highly homologous regions with a *Drosophila* polyhomeotic protein. *Differentiation* **57**, 39-50.

**Nusslein-Volhard, C., Kluding, H. and Jurgens, G.** (1985). Genes affecting the segmental subdivision of the *Drosophila* embryo. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **50**, 145-54.

**Oktaba, K., Gutierrez, L., Gagneur, J., Girardot, C., Sengupta, A. K., Furlong, E. E. and Muller, J.** (2008). Dynamic regulation by polycomb group protein complexes controls pattern formation and the cell cycle in *Drosophila*. *Dev Cell* **15**, 877-89.

**Ollmann, M., Young, L. M., Di Como, C. J., Karim, F., Belvin, M., Robertson, S., Whittaker, K., Demsky, M., Fisher, W. W., Buchman, A. et al.** (2000). *Drosophila* p53 is a structural and functional homolog of the tumor suppressor p53. *Cell* **101**, 91-101.

**Orlando, V., Jane, E. P., Chinwalla, V., Harte, P. J. and Paro, R.** (1998). Binding of trithorax and Polycomb proteins to the bithorax complex: dynamic changes during early *Drosophila* embryogenesis. *EMBO J* **17**, 5141-50.

**Osipo, C., Patel, P., Rizzo, P., Clementz, A. G., Hao, L., Golde, T. E. and Miele, L.** (2008). ErbB-2 inhibition activates Notch-1 and sensitizes breast cancer cells to a gamma-secretase inhibitor. *Oncogene* **27**, 5019-32.

**Pagliarini, R. A., Quinones, A. T. and Xu, T.** (2003). Analyzing the function of tumor suppressor genes using a *Drosophila* model. *Methods Mol Biol* **223**, 349-82.

**Pagliarini, R. A. and Xu, T.** (2003). A genetic screen in *Drosophila* for metastatic behavior. *Science* **302**, 1227-31.

**Pannequin, J., Bonnans, C., Delaunay, N., Ryan, J., Bourgaux, J. F., Joubert, D. and Hollande, F.** (2009). The wnt target jagged-1 mediates the activation of notch signaling by progastrin in human colorectal cancer cells. *Cancer Res* **69**, 6065-73.

**Papp, B. and Muller, J.** (2006). Histone trimethylation and the maintenance of transcriptional ON and OFF states by trxG and PcG proteins. *Genes Dev* **20**, 2041-54.

**Parks, A. L., Cook, K. R., Belvin, M., Dompe, N. A., Fawcett, R., Huppert, K., Tan, L. R., Winter, C. G., Bogart, K. P., Deal, J. E. et al.** (2004). Systematic generation of high-resolution deletion coverage of the *Drosophila melanogaster* genome. *Nat Genet* **36**, 288-92.



- Paro, R.** (1995). Propagating memory of transcriptional states. *Trends Genet* **11**, 295-7.
- Pattatucci, A. M. and Kaufman, T. C.** (1991). The homeotic gene *Sex combs reduced* of *Drosophila melanogaster* is differentially regulated in the embryonic and imaginal stages of development. *Genetics* **129**, 443-61.
- Paukku, K., Yang, J. and Silvennoinen, O.** (2003). Tudor and nuclease-like domains containing protein p100 function as coactivators for signal transducer and activator of transcription 5. *Mol Endocrinol* **17**, 1805-14.
- Pavlopoulos, A. and Akam, M.** (2011). Hox gene *Ultrabithorax* regulates distinct sets of target genes at successive stages of *Drosophila* haltere morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 2855-60.
- Pelengaris, S., Khan, M. and Evan, G.** (2002). c-MYC: more than just a matter of life and death. *Nat Rev Cancer* **2**, 764-76.
- Perez-Garijo, A., Martin, F. A. and Morata, G.** (2004). Caspase inhibition during apoptosis causes abnormal signalling and developmental aberrations in *Drosophila*. *Development* **131**, 5591-8.
- Peterson, C. L., Dingwall, A. and Scott, M. P.** (1994). Five SWI/SNF gene products are components of a large multisubunit complex required for transcriptional enhancement. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 2905-8.
- Petruk, S., Sedkov, Y., Smith, S., Tillib, S., Kraevski, V., Nakamura, T., Canaani, E., Croce, C. M. and Mazo, A.** (2001). Trithorax and dCBP acting in a complex to maintain expression of a homeotic gene. *Science* **294**, 1331-4.
- Pietersen, A. M. and van Lohuizen, M.** (2008). Stem cell regulation by polycomb repressors: postponing commitment. *Curr Opin Cell Biol* **20**, 201-7.
- Pirrotta, V.** (1997). PcG complexes and chromatin silencing. *Curr Opin Genet Dev* **7**, 249-58.
- Posakony, L. G., Raftery, L. A. and Gelbart, W. M.** (1990). Wing formation in *Drosophila melanogaster* requires decapentaplegic gene function along the anterior-posterior compartment boundary. *Mech Dev* **33**, 69-82.
- Potter, M. D., Buijs, A., Kreider, B., van Rompaey, L. and Grosveld, G. C.** (2000). Identification and characterization of a new human ETS-family transcription factor, TEL2, that is expressed in hematopoietic tissues and can associate with TEL1/ETV6. *Blood* **95**, 3341-8.
- Probst, A. V., Dunleavy, E. and Almouzni, G.** (2009). Epigenetic inheritance during the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 192-206.
- Qiao, F. and Bowie, J. U.** (2005). The many faces of SAM. *Sci STKE* **2005**, re7.
- Raaphorst, F. M., Vermeer, M., Fieret, E., Blokzijl, T., Dukers, D., Sewalt, R. G., Otte, A. P., Willemze, R. and Meijer, C. J.** (2004). Site-specific expression of polycomb-group genes encoding the HPC-HPH/PRC1 complex in clinically defined primary nodal and cutaneous large B-cell lymphomas. *Am J Pathol* **164**, 533-42.

**Rabinow, L.** (2002). The proliferation of *Drosophila* in cancer research: a system for the functional characterization of tumor suppressors and oncogenes. *Cancer Invest* **20**, 531-56.

**Rajasekhar, V. K. and Begemann, M.** (2007). Concise review: roles of polycomb group proteins in development and disease: a stem cell perspective. *Stem Cells* **25**, 2498-510.

**Ranganathan, P., Weaver, K. L. and Capobianco, A. J.** (2011). Notch signalling in solid tumours: a little bit of everything but not all the time. *Nat Rev Cancer* **11**, 338-51.

**Rebay, I., Fleming, R. J., Fehon, R. G., Cherbas, L., Cherbas, P. and Artavanis-Tsakonas, S.** (1991). Specific EGF repeats of Notch mediate interactions with Delta and Serrate: implications for Notch as a multifunctional receptor. *Cell* **67**, 687-99.

**Remillieux-Leschelle, N., Santamaria, P. and Randsholt, N. B.** (2002). Regulation of larval hematopoiesis in *Drosophila melanogaster*: a role for the multi sex combs gene. *Genetics* **162**, 1259-74.

**Reynolds-Kenneally, J. and Mlodzik, M.** (2005). Notch signaling controls proliferation through cell-autonomous and non-autonomous mechanisms in the *Drosophila* eye. *Dev Biol* **285**, 38-48.

**Ringrose, L. and Paro, R.** (2007). Polycomb/Trithorax response elements and epigenetic memory of cell identity. *Development* **134**, 223-32.

**Roch, F. and Akam, M.** (2000). Ultrabithorax and the control of cell morphology in *Drosophila* halteres. *Development* **127**, 97-107.

**Rogulja, D. and Irvine, K. D.** (2005). Regulation of cell proliferation by a morphogen gradient. *Cell* **123**, 449-61.

**Rogulja-Ortmann, A., Renner, S. and Technau, G. M.** (2008). Antagonistic roles for Ultrabithorax and Antennapedia in regulating segment-specific apoptosis of differentiated motoneurons in the *Drosophila* embryonic central nervous system. *Development* **135**, 3435-45.

**Rubin, G. M. and Spradling, A. C.** (1982). Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science* **218**, 348-53.

**Ryoo, H. D. and Bergmann, A.** (2012). The role of apoptosis-induced proliferation for regeneration and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**, a008797.

**Ryoo, H. D., Gorenc, T. and Steller, H.** (2004). Apoptotic cells can induce compensatory cell proliferation through the JNK and the Wingless signaling pathways. *Dev Cell* **7**, 491-501.

**Salles, F. J., Lieberfarb, M. E., Wreden, C., Gergen, J. P. and Strickland, S.** (1994). Coordinate initiation of *Drosophila* development by regulated polyadenylation of maternal messenger RNAs. *Science* **266**, 1996-9.

**Sanchez-Beato, M., Sanchez, E., Garcia, J. F., Perez-Rosado, A., Montoya, M. C., Fraga, M., Artiga, M. J., Navarrete, M., Abaira, V., Morente, M. et al.** (2004). Abnormal PcG protein expression in Hodgkin's lymphoma. Relation with E2F6 and NFkappaB transcription factors. *J Pathol* **204**, 528-37.

**Sanchez-Beato, M., Sanchez, E., Gonzalez-Carrero, J., Morente, M., Diez, A., Sanchez-Verde, L., Martin, M. C., Cigudosa, J. C., Vidal, M. and Piris, M. A.** (2006). Variability in the expression of polycomb proteins in different normal and tumoral tissues. A pilot study using tissue microarrays. *Mod Pathol* **19**, 684-94.

**Sanchez-Herrero, E.** (1991). Control of the expression of the bithorax complex genes abdominal-A and abdominal-B by cis-regulatory regions in *Drosophila* embryos. *Development* **111**, 437-49.

**Sanchez-Herrero, E., Vernos, I., Marco, R. and Morata, G.** (1985). Genetic organization of *Drosophila* bithorax complex. *Nature* **313**, 108-13.

**Sanicola, M., Sekelsky, J., Elson, S. and Gelbart, W. M.** (1995). Drawing a stripe in *Drosophila* imaginal disks: negative regulation of decapentaplegic and patched expression by engrailed. *Genetics* **139**, 745-56.

**Sanson, B.** (2001). Generating patterns from fields of cells. Examples from *Drosophila* segmentation. *EMBO Rep* **2**, 1083-8.

**Scadden, A. D.** (2005). The RISC subunit Tudor-SN binds to hyper-edited double-stranded RNA and promotes its cleavage. *Nat Struct Mol Biol* **12**, 489-96.

**Scheuermann, J. C., de Ayala Alonso, A. G., Oktaba, K., Ly-Hartig, N., McGinty, R. K., Fraterman, S., Wilm, M., Muir, T. W. and Muller, J.** (2010). Histone H2A deubiquitinase activity of the Polycomb repressive complex PR-DUB. *Nature* **465**, 243-7.

**Schuettengruber, B. and Cavalli, G.** (2010). The DUBle life of polycomb complexes. *Dev Cell* **18**, 878-80.

**Schuettengruber, B., Chourrout, D., Vervoort, M., Leblanc, B. and Cavalli, G.** (2007). Genome regulation by polycomb and trithorax proteins. *Cell* **128**, 735-45.

**Schuettengruber, B., Ganapathi, M., Leblanc, B., Portoso, M., Jaschek, R., Tolhuis, B., van Lohuizen, M., Tanay, A. and Cavalli, G.** (2009). Functional anatomy of polycomb and trithorax chromatin landscapes in *Drosophila* embryos. *PLoS Biol* **7**, e13.

**Schuettengruber, B., Martinez, A. M., Iovino, N. and Cavalli, G.** (2011). Trithorax group proteins: switching genes on and keeping them active. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**, 799-814.

**Schwank, G. and Basler, K.** (2010). Regulation of organ growth by morphogen gradients. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a001669.

**Schwartz, Y. B., Kahn, T. G., Nix, D. A., Li, X. Y., Bourgon, R., Biggin, M. and Pirrotta, V.** (2006). Genome-wide analysis of Polycomb targets in *Drosophila melanogaster*. *Nat Genet* **38**, 700-5.

**Schwartz, Y. B. and Pirrotta, V.** (2007). Polycomb silencing mechanisms and the management of genomic programmes. *Nat Rev Genet* **8**, 9-22.

**Schwartz, Y. B. and Pirrotta, V.** (2008). Polycomb complexes and epigenetic states. *Curr Opin Cell Biol* **20**, 266-73.

**Shannon, M. P., Kaufman, T. C., Shen, M. W. and Judd, B. H.** (1972). Lethality patterns and morphology of selected lethal and semi-lethal mutations in the zeste-white region of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **72**, 615-38.

**Shao, Z., Raible, F., Mollaaghababa, R., Guyon, J. R., Wu, C. T., Bender, W. and Kingston, R. E.** (1999). Stabilization of chromatin structure by PRC1, a Polycomb complex. *Cell* **98**, 37-46.

**Shlevkov, E. and Morata, G.** (2012). A dp53/JNK-dependant feedback amplification loop is essential for the apoptotic response to stress in *Drosophila*. *Cell Death Differ* **19**, 451-60.

**Simon, J., Chiang, A., Bender, W., Shimell, M. J. and O'Connor, M.** (1993). Elements of the *Drosophila* bithorax complex that mediate repression by Polycomb group products. *Dev Biol* **158**, 131-44.

**Slee, E. A., O'Connor, D. J. and Lu, X.** (2004). To die or not to die: how does p53 decide? *Oncogene* **23**, 2809-18.

**Small, J. V., Zobeley, S., Rinnerthaler, G. and Faulstich, H.** (1988). Coumarin-phalloidin: a new actin probe permitting triple immunofluorescence microscopy of the cytoskeleton. *J Cell Sci* **89** ( Pt 1), 21-4.

**Smith, C. L. and Peterson, C. L.** (2005). ATP-dependent chromatin remodeling. *Curr Top Dev Biol* **65**, 115-48.

**Smith, S. T., Petruk, S., Sedkov, Y., Cho, E., Tillib, S., Canaani, E. and Mazo, A.** (2004). Modulation of heat shock gene expression by the TAC1 chromatin-modifying complex. *Nat Cell Biol* **6**, 162-7.

**Sogame, N., Kim, M. and Abrams, J. M.** (2003). *Drosophila* p53 preserves genomic stability by regulating cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 4696-701.

**Spencer, F. A., Hoffmann, F. M. and Gelbart, W. M.** (1982). Decapentaplegic: a gene complex affecting morphogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Cell* **28**, 451-61.

**Spradling, A. C., Stern, D., Beaton, A., Rhem, E. J., Lavery, T., Mozden, N., Misra, S. and Rubin, G. M.** (1999). The Berkeley *Drosophila* Genome Project gene disruption project: Single P-element insertions mutating 25% of vital *Drosophila* genes. *Genetics* **153**, 135-77.

**Stassen, M. J., Bailey, D., Nelson, S., Chinwalla, V. and Harte, P. J.** (1995). The *Drosophila* trithorax proteins contain a novel variant of the nuclear receptor type DNA binding domain and an ancient conserved motif found in other chromosomal proteins. *Mech Dev* **52**, 209-23.

**Strigini, M. and Cohen, S. M.** (1999). Formation of morphogen gradients in the *Drosophila* wing. *Semin Cell Dev Biol* **10**, 335-44.

**Strutt, H., Cavalli, G. and Paro, R.** (1997). Co-localization of Polycomb protein and GAGA factor on regulatory elements responsible for the maintenance of homeotic gene expression. *EMBO J* **16**, 3621-32.

**Tamkun, J. W., Deuring, R., Scott, M. P., Kissinger, M., Pattatucci, A. M., Kaufman, T. C. and Kennison, J. A.** (1992). *brahma*: a regulator of *Drosophila*

homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2. *Cell* **68**, 561-72.

**Tanaka, Y., Katagiri, Z., Kawahashi, K., Kioussis, D. and Kitajima, S.** (2007). Trithorax-group protein ASH1 methylates histone H3 lysine 36. *Gene* **397**, 161-8.

**Tapia, C., Kutzner, H., Mentzel, T., Savic, S., Baumhoer, D. and Glatz, K.** (2006). Two mitosis-specific antibodies, MPM-2 and phospho-histone H3 (Ser28), allow rapid and precise determination of mitotic activity. *Am J Surg Pathol* **30**, 83-9.

**Tavares, L., Dimitrova, E., Oxley, D., Webster, J., Poot, R., Demmers, J., Bezstarosti, K., Taylor, S., Ura, H., Koide, H. et al.** (2012). RYBP-PRC1 complexes mediate H2A ubiquitylation at polycomb target sites independently of PRC2 and H3K27me3. *Cell* **148**, 664-78.

**Tavassoli, M., Guelen, L., Luxon, B. A. and Gaken, J.** (2005). Apoptin: specific killer of tumor cells? *Apoptosis* **10**, 717-24.

**Tepass, U., Tanentzapf, G., Ward, R. and Fehon, R.** (2001). Epithelial cell polarity and cell junctions in *Drosophila*. *Annu Rev Genet* **35**, 747-84.

**Thacker, S. A., Bonnette, P. C. and Duronio, R. J.** (2003). The contribution of E2F-regulated transcription to *Drosophila* PCNA gene function. *Curr Biol* **13**, 53-8.

**Tillib, S., Petruk, S., Sedkov, Y., Kuzin, A., Fujioka, M., Goto, T. and Mazo, A.** (1999). Trithorax- and Polycomb-group response elements within an Ultrabithorax transcription maintenance unit consist of closely situated but separable sequences. *Mol Cell Biol* **19**, 5189-202.

**Tiong, S., Bone, L. M. and Whittle, J. R.** (1985). Recessive lethal mutations within the bithorax-complex in *Drosophila*. *Mol Gen Genet* **200**, 335-42.

**Tong, X., Drapkin, R., Yalamanchili, R., Mosialos, G. and Kieff, E.** (1995). The Epstein-Barr virus nuclear protein 2 acidic domain forms a complex with a novel cellular coactivator that can interact with TFIIE. *Mol Cell Biol* **15**, 4735-44.

**Tsukada, Y., Fang, J., Erdjument-Bromage, H., Warren, M. E., Borchers, C. H., Tempst, P. and Zhang, Y.** (2006). Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature* **439**, 811-6.

**Tu, H., Barr, M., Dong, D. L. and Wigler, M.** (1997). Multiple regulatory domains on the Byr2 protein kinase. *Mol Cell Biol* **17**, 5876-87.

**Vaccari, T. and Bilder, D.** (2009). At the crossroads of polarity, proliferation and apoptosis: the use of *Drosophila* to unravel the multifaceted role of endocytosis in tumor suppression. *Mol Oncol* **3**, 354-65.

**van der Knaap, J. A., Kozhevnikova, E., Langenberg, K., Moshkin, Y. M. and Verrijzer, C. P.** (2010). Biosynthetic enzyme GMP synthetase cooperates with ubiquitin-specific protease 7 in transcriptional regulation of ecdysteroid target genes. *Mol Cell Biol* **30**, 736-44.

**Venken, K. J., Popodi, E., Holtzman, S. L., Schulze, K. L., Park, S., Carlson, J. W., Hoskins, R. A., Bellen, H. J. and Kaufman, T. C.** (2010). A molecularly defined duplication set for the X chromosome of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **186**, 1111-25.

- Vidal, M. and Cagan, R. L. (2006). Drosophila models for cancer research. *Curr Opin Genet Dev* **16**, 10-6.
- Vignali, M., Hassan, A. H., Neely, K. E. and Workman, J. L. (2000). ATP-dependent chromatin-remodeling complexes. *Mol Cell Biol* **20**, 1899-910.
- Vousden, K. H. and Lane, D. P. (2007). p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 275-83.
- Walter, D., Matter, A. and Fahrenkrog, B. (2010). Bre1p-mediated histone H2B ubiquitylation regulates apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci* **123**, 1931-9.
- Wang, H., Wang, L., Erdjument-Bromage, H., Vidal, M., Tempst, P., Jones, R. S. and Zhang, Y. (2004a). Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature* **431**, 873-8.
- Wang, L., Brown, J. L., Cao, R., Zhang, Y., Kassisi, J. A. and Jones, R. S. (2004b). Hierarchical recruitment of polycomb group silencing complexes. *Mol Cell* **14**, 637-46.
- Wang, L., Li, Z. and Cai, Y. (2008). The JAK/STAT pathway positively regulates DPP signaling in the Drosophila germline stem cell niche. *J Cell Biol* **180**, 721-8.
- Wang, S., Robertson, G. P. and Zhu, J. (2004c). A novel human homologue of Drosophila polycomblike gene is up-regulated in multiple cancers. *Gene* **343**, 69-78.
- Wells, B. S. and Johnston, L. A. (2012). Maintenance of imaginal disc plasticity and regenerative potential in Drosophila by p53. *Dev Biol* **361**, 263-76.
- White, K., Grether, M. E., Abrams, J. M., Young, L., Farrell, K. and Steller, H. (1994). Genetic control of programmed cell death in Drosophila. *Science* **264**, 677-83.
- White, R. A. and Wilcox, M. (1984). Protein products of the bithorax complex in Drosophila. *Cell* **39**, 163-71.
- Williams, M. J. (2007). Drosophila hemopoiesis and cellular immunity. *J Immunol* **178**, 4711-6.
- Woods, D. F., Wu, J. W. and Bryant, P. J. (1997). Localization of proteins to the apico-lateral junctions of Drosophila epithelia. *Dev Genet* **20**, 111-8.
- Wu, C. T. and Howe, M. (1995). A genetic analysis of the Suppressor 2 of zeste complex of Drosophila melanogaster. *Genetics* **140**, 139-81.
- Xu, D., Woodfield, S. E., Lee, T. V., Fan, Y., Antonio, C. and Bergmann, A. (2009). Genetic control of programmed cell death (apoptosis) in Drosophila. *Fly (Austin)* **3**, 78-90.
- Xu, T. and Rubin, G. M. (1993). Analysis of genetic mosaics in developing and adult Drosophila tissues. *Development* **117**, 1223-37.
- Yamasaki, S., Yagishita, N., Sasaki, T., Nakazawa, M., Kato, Y., Yamadera, T., Bae, E., Toriyama, S., Ikeda, R., Zhang, L. et al. (2007). Cytoplasmic destruction of p53 by the endoplasmic reticulum-resident ubiquitin ligase 'Synoviolin'. *EMBO J* **26**, 113-22.



**Yang, J., Aittomaki, S., Pesu, M., Carter, K., Saarinen, J., Kalkkinen, N., Kieff, E. and Silvennoinen, O.** (2002). Identification of p100 as a coactivator for STAT6 that bridges STAT6 with RNA polymerase II. *EMBO J* **21**, 4950-8.

**Yang, J., Valineva, T., Hong, J., Bu, T., Yao, Z., Jensen, O. N., Frilander, M. J. and Silvennoinen, O.** (2007). Transcriptional co-activator protein p100 interacts with snRNP proteins and facilitates the assembly of the spliceosome. *Nucleic Acids Res* **35**, 4485-94.

**Yugawa, T., Handa, K., Narisawa-Saito, M., Ohno, S., Fujita, M. and Kiyono, T.** (2007). Regulation of Notch1 gene expression by p53 in epithelial cells. *Mol Cell Biol* **27**, 3732-42.

**Zavortink, M. and Sakonju, S.** (1989). The morphogenetic and regulatory functions of the *Drosophila* Abdominal-B gene are encoded in overlapping RNAs transcribed from separate promoters. *Genes Dev* **3**, 1969-81.

**Zecca, M., Basler, K. and Struhl, G.** (1995). Sequential organizing activities of engrailed, hedgehog and decapentaplegic in the *Drosophila* wing. *Development* **121**, 2265-78.

**Zecca, M., Basler, K. and Struhl, G.** (1996). Direct and long-range action of a wingless morphogen gradient. *Cell* **87**, 833-44.

**Zecca, M. and Struhl, G.** (2002). Subdivision of the *Drosophila* wing imaginal disc by EGFR-mediated signaling. *Development* **129**, 1357-68.

**Zhang, H., Christoforou, A., Aravind, L., Emmons, S. W., van den Heuvel, S. and Haber, D. A.** (2004). The *C. elegans* Polycomb gene SOP-2 encodes an RNA binding protein. *Mol Cell* **14**, 841-7.

**Zhang, H., Xu, Q., Krajewski, S., Krajewska, M., Xie, Z., Fuess, S., Kitada, S., Pawlowski, K., Godzik, A. and Reed, J. C.** (2000). BAR: An apoptosis regulator at the intersection of caspases and Bcl-2 family proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 2597-602.

**Zhang, Y., Lin, N., Carroll, P. M., Chan, G., Guan, B., Xiao, H., Yao, B., Wu, S. S. and Zhou, L.** (2008). Epigenetic blocking of an enhancer region controls irradiation-induced proapoptotic gene expression in *Drosophila* embryos. *Dev Cell* **14**, 481-93.



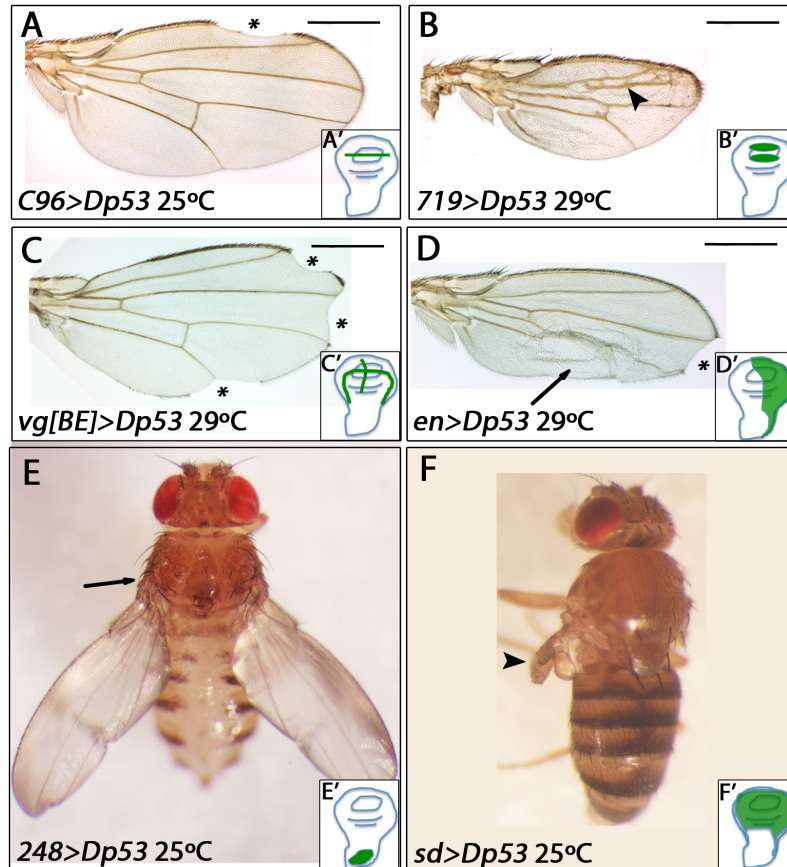


ANEXOS

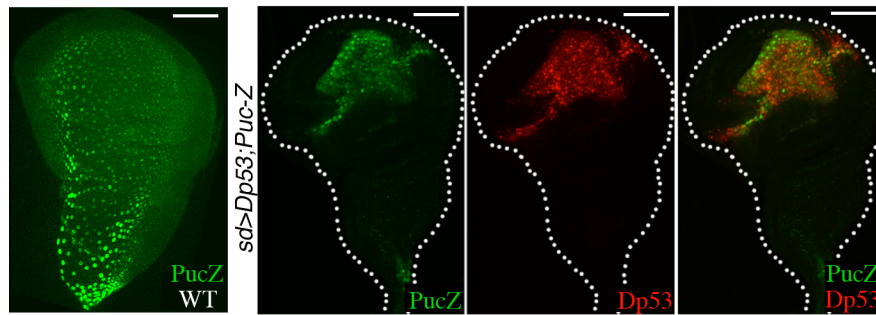
---



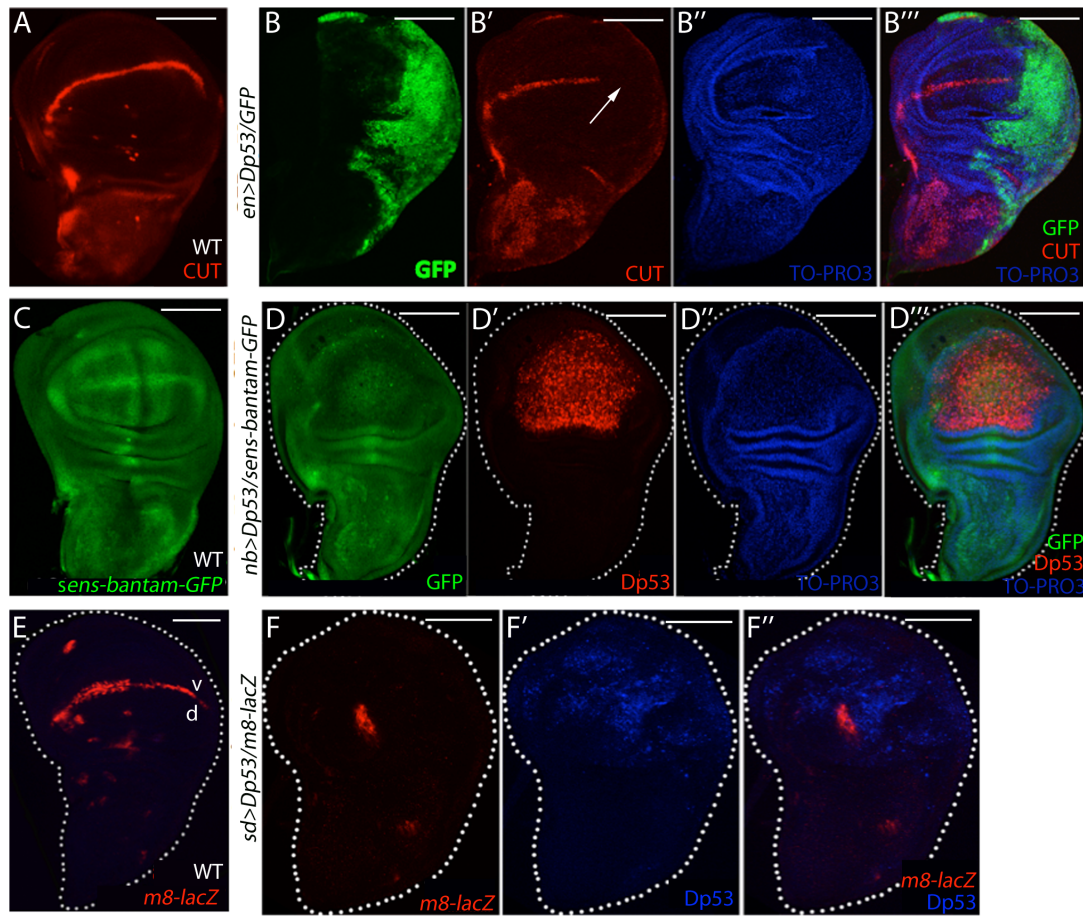
**ANEXO 1.- Representación esquemática de los sitios de unión del factor de transcripción STAT en la secuencia de la construcción *dpp-lacZ<sup>Bss.0</sup>***



**ANEXO 2.- Efectos de la sobre-expresión de Dp53 en el ala con las diferentes líneas GAL4 utilizadas.** **A)** Ala C-96-GAL4/UAS-Dp53. Nótese la presencia de “notchings” (asterisco) en el margen del ala. **A’)** Representación esquemática del dominio de expresión de la línea C-96-GAL4 en las células del borde D/V (verde) del disco imaginal de ala que dará lugar al margen del ala adulta. **B)** Ala 719-GAL4/UAS-Dp53. Nótese la reducción del tamaño del ala y la malformación de las venas (cabeza de flecha). **B’)** Representación esquemática del dominio de expresión de la línea 719-GAL4 en las células dorsales y ventrales del *wing pouch* (verde) del disco imaginal de ala que dará lugar a la región dorsal y ventral del ala adulta. **C)** Ala *vg[BE]*-GAL4/UAS-Dp53. Nótese la presencia de “notchings” (asterisco) en el margen del ala. **C’)** Representación esquemática del dominio de expresión de la línea *vg*-GAL4 en las células del borde D/V y del borde A/P (verde) del disco imaginal de ala. **D)** Ala *en*-GAL4/UAS-Dp53 ampollada (flecha). Nótese la presencia de “notchings” (asterisco) en el margen del ala. **D’)** Representación esquemática del dominio de expresión de la línea *en*-GAL4 en las células del compartimento posterior (verde) del disco imaginal de ala que dará lugar al compartimento posterior del ala adulta. **E)** Mosca 248-GAL4/UAS-Dp53. Nótese que el notum está semifusionado (flecha). Las alas y el abdomen están afectados debido a un efecto no autónomo. **E’)** Representación esquemática del dominio de expresión de la línea 248-GAL4 en las células del *notum* (verde) del disco imaginal de ala que dará lugar al tórax o *notum* del individuo adulto. **F)** Mosca *sd*-GAL4/+; UAS-Dp53/+ con el ala de tamaño muy reducido y duplicada (cabeza de flecha). **F’)** Representación esquemática del dominio de expresión de la línea *sd*-GAL4 en las células del *wing pouch* (verde) que dará lugar al ala adulta propiamente dicha.



**ANEXO 3.- Altos niveles de Dp53 inducen la activación de la vía JNK. A)** Disco imaginal de ala Puc-lacZ/+ mostrando expresión de lacZ (verde) en la membrana peripodial. **(B-B'')** Discos imaginales de ala sd-GAL4/+; UAS-Dp53/+; Puc-lacZ/+. **B)** Expresión de lacZ (verde). Nótese la expresión de lacZ ectópica en las células del disco propio. **B')** Expresión de Dp53 (rojo). **B'')** Superposición de las imágenes B y B'.



**ANEXO 4.- Efecto de la sobre-expresión de Dp53 en la expresión de Cut, bantam-sensor y m8-lacZ y la formación del borde D/V del disco imaginal de ala.** **A)** Disco imaginal de ala silvestre (wt) mostrando expresión de Cut (rojo). **(B-B''')** Discos imaginales de ala *en-GAL4, UAS-GFP/UAS-Dp53*. **B)** Expresión de GFP (verde) en el compartimento posterior. **B')** Expresión de Cut (rojo). Nótese la pérdida de la expresión de Cut en el compartimento posterior (flecha) donde Dp53 se está sobre-expresando. **B'')** Expresión de To-pro3 (azul). **B''')** Superposición de imágenes B, B' y B''. **C)** Disco imaginal de ala *sensor-bantam-GFP/+* mostrando expresión de GFP como reportero de la expresión del sensor del micro-ARN bantam. **(D-D''')** Discos imaginales de ala *nb-GAL4/UAS-Dp53; sensor-bantam-GFP/+*. **D)** Expresión de GFP (verde). Nótese la ausencia de expresión del sensor indicando que bantam está activo. **D')** Expresión de Dp53 (rojo). **D'')** Expresión de To-pro3 (azul). **D''')** Superposición de imágenes D, D' y D''. **E)** Disco imaginal de ala *m8-lacZ/+* mostrando expresión de lacZ (rojo). **(F-F'')** Discos imaginales de ala *sd-GAL4/+; UAS-Dp53/m8-lacZ*. **F)** Expresión de lacZ (rojo). Nótese la ausencia de expresión de lacZ en el borde D/V indicativo de la desaparición del mismo. **F')** Expresión de Dp53 (azul). **F'')** Superposición de imágenes F y F'.



# The Polyhomeotic protein induces hyperplastic tissue overgrowth through the activation of the JAK/STAT pathway

Inma González,<sup>1,†</sup> Rocío Simón<sup>2,†</sup> and Ana Busturia<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Institut de Génétique Humaine; CNRS; Montpellier, France; <sup>2</sup>Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM); Madrid, Spain

<sup>†</sup>These authors contributed equally to this work.

**Key words:** Polyhomeotic, Polycomb, JAK/STAT, dpp, d-myc, overgrowth, Drosophila

Epigenetic mechanisms controlling cellular proliferation are essential to animal development. Moreover, altered levels of expression of the epigenetic regulator proteins are associated with the development and progression of human diseases like cancer. We have studied the effects of high levels of Polyhomeotic (PH) protein, a member of the Polycomb Group (PcG), during the proliferation of the imaginal discs in Drosophila. Overexpression of PH protein causes induction of proliferation, accompanied with induction of JNK-dependent apoptosis. As a result, massive hyperplastic overgrowth is produced and the corresponding differentiated tissues show phenotypes related with mis-regulation of homeotic gene expression. We have found that high levels of PH upregulate the JAK/STAT pathway through the de-repression of Unpaired (UPD), the extracellular ligand of the Drosophila JAK/STAT signalling cascade. Moreover, inactivation of the JAK/STAT pathway in the presence of a large amount of PH protein greatly reduces the tissue overgrowth, demonstrating a functional role of JAK/STAT in PH-induced hyperplasia. Finally, we have observed that *decapentaplegic* and *d-myc*, two growth genes and putative targets of the JAK/STAT pathway, are also overexpressed in the PH-induced tumors. We propose that during normal development, the PcG proteins act to maintain inactive the JAK/STAT pathway. Upon cellular stress, changes in the levels of PcG proteins expression are induced and JAK/STAT is activated leading to tumor development. Our results show a functional relationship between the PcG gene expression and the JAK/STAT pathway, both of which are found to be perturbed in tumorigenesis.

## Introduction

Epigenetic regulation of gene expression has been shown to be crucial for the development of organisms by maintaining cellular fates during proliferation.<sup>1,2</sup> Moreover, variations in both epigenetic proteins expression and patterns of histone modifications are related with the development and progression of cancer.<sup>3-5</sup> The *Polycomb* (*PcG*) and *trithorax* (*trxG*) group of genes were initially discovered in Drosophila as regulators of homeotic gene expression.<sup>6</sup> However, studies in vertebrates as well as recent studies in Drosophila support the idea that *PcG* and *trxG* genes also have important roles in other biological processes, such as hematopoiesis, stem cell renewal, cellular proliferation and neoplastic development.<sup>2,7-11</sup>

PcG and *trxG* are phylogenetically conserved proteins and encode for chromatin binding factors that function as multimeric complexes with unique biochemical activities.<sup>12</sup> Three complexes containing PcG proteins have been isolated in Drosophila: PRC1,<sup>13</sup> PRC2,<sup>14,15</sup> and PhoRC.<sup>16</sup> Polyhomeotic (PH), a zinc finger protein, is a subunit of PRC1 (Polycomb Repressive complex 1). PRC1 also contains Polycomb (PC), a chromodomain

protein that can bind to trimethylated lysine 27 of histone H3 (H3k27me3), Sex comb extra/Ring1 (SCE), with E3 ligase activity for ubiquitylation of Histone H2A at Lysine 119, and Posterior sex comb (PSC), a Ring domain protein.<sup>12</sup> PRC1, PRC2 and PhoRC complexes bind to the Polycomb Response Elements, (PREs), cis-regulatory DNA elements found in PcG/*trxG* gene targets.<sup>17</sup>

High levels of the HPH1 protein, the human homolog of Drosophila PH<sup>18</sup> and altered levels of PcG proteins have been found in numerous types of human cancers.<sup>19-22</sup> However, little is known regarding how a modulation in the expression levels or in the activity of PcG proteins could influence cellular homeostasis and either be beneficial for the survival of organisms or be detrimental and lead to pathogenesis. The study of the pathways affected by altering the levels of PcG proteins should help the understanding of PcG function in these processes. As PcG proteins and developmental growth pathways are highly conserved from flies to humans,<sup>23</sup> such studies serve as a useful model for human cancer research.<sup>24</sup>

The conserved JAK/STAT cascade plays an important role in a wide spectrum of biological processes, including the response of

\*Correspondence to: Ana Busturia; Email: abusturia@cbm.uam.es

Submitted: 08/28/09; Revised: 09/22/09; Accepted: 09/30/09

Previously published online: www.landesbioscience.com/journals/cc/article/10212

the immune system and stem cell maintenance.<sup>25</sup> Furthermore, this pathway is deregulated in many cancers.<sup>26-29</sup> The canonical JAK/STAT pathway in *Drosophila*<sup>30</sup> is activated upon binding to the transmembrane receptor Domeless (encoded by *dome*), of the Unpaired (UPD) proteins, *Drosophila* cytokines encoded by the *outstretched* (*os*), *unpaired 2* (*upd2*) and *unpaired 3* (*upd3*) genes. DOME, in turn, associates with the JAK tyrosine kinase (encoded by *hopscotch*) and the transcription factor STAT92E (encoded by *stat92E*), resulting in the phosphorylation of STAT92E, which then enters the nucleus to regulate the transcription of its targets.<sup>30</sup>

Recent work has linked the epigenetic regulation of gene expression and the JAK/STAT pathway. RNAi screens in S2 cells for novel regulators of the JAK/STAT pathway have identified chromatin modifier loci, among them the PcG/trxG genes.<sup>31,32</sup> We have begun a systematic investigation of the phenotypes generated by both the overexpression and the inactivation of the PcG proteins during the imaginal discs growth. Here we present the results obtained of the overexpression of the epigenetic PH regulator protein and show that this produces massive hyperplastic overgrowth and that this is mediated via the JAK/STAT pathway.

## Results and Discussion

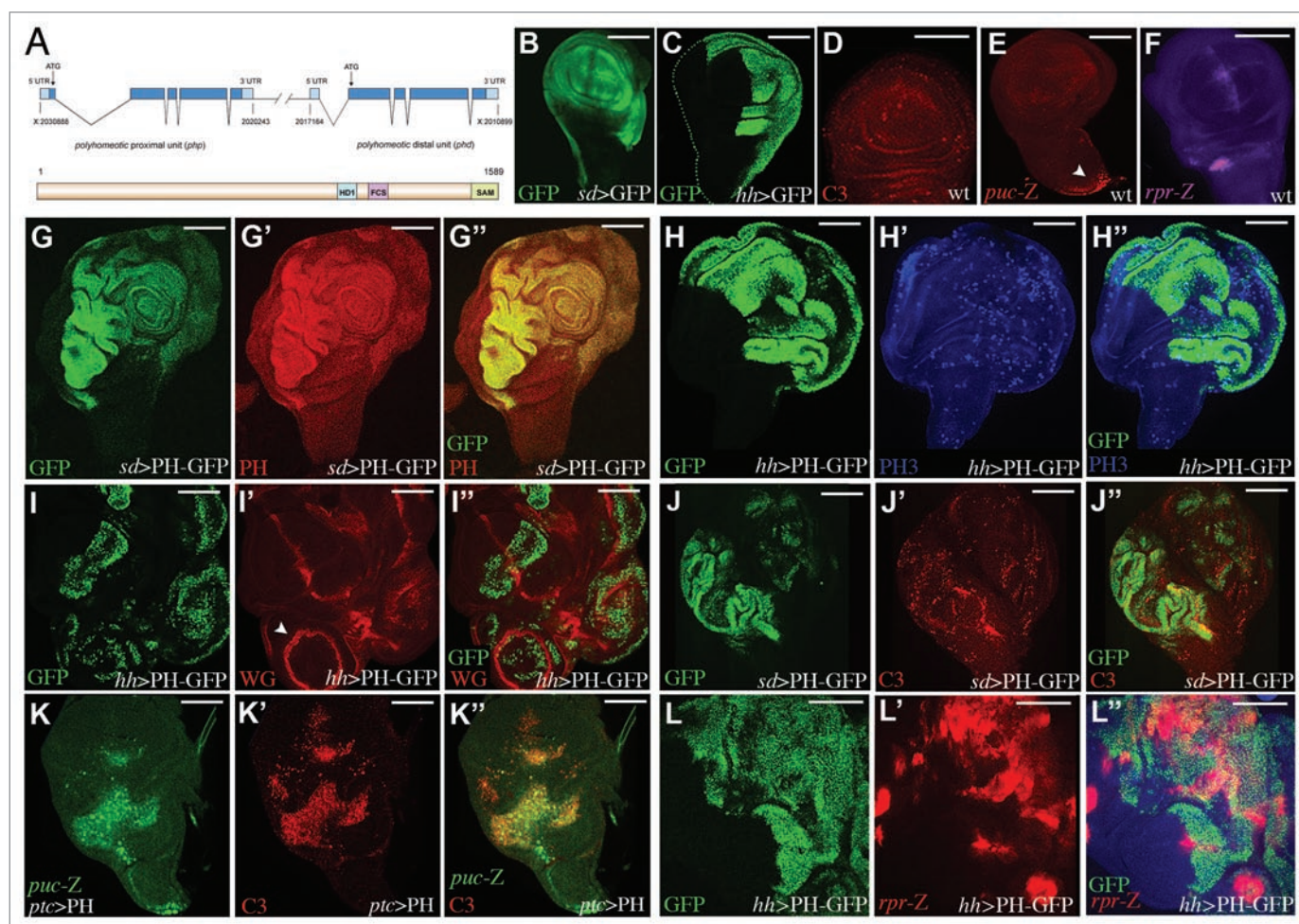
**High levels of Polyhomeotic induces hyperplastic overgrowth and tissue differentiation.** The *Drosophila polyhomeotic* locus consists of two homologous transcription units: *polyhomeotic* proximal (*ph-p*) and *polyhomeotic* distal (*ph-d*)<sup>33</sup> (Fig. 1A), coding for two related proteins which are ubiquitously expressed.<sup>34</sup> We overexpressed the PH-P protein (see Materials and Methods) using the GAL4/UAS system<sup>35</sup> and we confirmed increased levels of the PH transcripts by quantitative RT-PCR (a 64-fold increase, data not shown) and by antibody staining (Fig. 1G–G’). In general, PH-overexpressing larvae remain in third instar stage longer time than wild type larvae, are bigger than wild type larvae, rarely reach the pupal stage and, if they do, die soon after. Their imaginal discs show very large overgrowths that produce multiples duplications of sections of the wing disc detected by the expression of wingless (WG) protein (Fig. 1I–I’), for a wild type expression of WG see Suppl. Fig. 1B). In addition to the high rates of proliferation (Fig. 1H–H’), we also observed increased apoptosis (Fig. 1J–J’), activation of the JNK pathway (Fig. 1K–K’) and activation of *reaper-lacZ* (*rpr-lacZ*) expression (Fig. 1L–L’). This proliferation can be considered hyperplastic because the apical/basal cellular localization<sup>36</sup> of either lethal giant disc or crumbs protein expression is not disrupted (data not shown).

We next studied whether over proliferated discs were able to differentiate by inducing PH-overexpressing clones and using the Gal80<sup>ts</sup>/Gal4 System (see Materials and Methods).<sup>37</sup> The resulting differentiated appendages are bigger than wild type and show homeotic transformations (Fig. 2D–H). The homeotic UBX (Ultrabithorax) protein expression was examined both in PH-overexpressing clones and in wing and haltere imaginal discs of *sdGAL4;UAS-ph-GFP/+* larvae. In wild type larvae, UBX protein is expressed in the haltere discs and in the

peripodial membrane of the wing disc but not in the wing disc proper (Fig. 2B).<sup>38</sup> In contrast, UBX expression is repressed in PH-overexpressing clones in the haltere discs (Fig. 2A–A’) and very weakly expressed in *sdGAL4;UAS-ph-GFP/+* wing discs (Fig. 2C). This very weak expression is not due to an effect of high levels of PH on *Abdominal-B* (*Abd-B*)<sup>39</sup> expression as Abd-B protein is not expressed in the *sdGAL4;UAS-ph-GFP/+* wing discs (not shown).

These results indicate that the alteration of the levels of the epigenetic regulator protein PH leads to an overgrowth of differentiated tissue accompanied by apoptosis and changes in cell identity. A requirement of PH for the maintenance of homeotic gene expression has been described.<sup>33,40</sup> Moreover, it has been shown that inactivation of PH induces overgrowth exhibiting strong de-repression of UBX protein expression in the wing discs.<sup>40</sup> In contrast, we find extremely weak UBX expression in the wing discs (Fig. 2C). Because inactivation of PH leads to tissue overgrowth, it has been proposed that this protein might function as a tumor suppressor gene.<sup>8</sup> Our results show that PH overexpression also produces tissue overgrowth, thereby qualifying PH as an oncogene. That PH can behave both as a tumor suppressor gene and as an oncogene can be explained by the nature and the broad range of targets of the PcG regulation of expression. Interestingly, this dual behavior may provide a mechanism by which expression levels or activity of PcG proteins can control cellular plasticity in normal as well as in pathological development.

**The JAK/STAT pathway is required for PH-induced hyperplasia.** We have investigated the developmental growth pathways<sup>23</sup> that could be involved in the generation of the PH-induced overgrowth. We hypothesized that the PcG proteins silence those pathways that are activated in response to cellular stress. We first focused on the JAK/STAT pathway as a plausible target of the PcG proteins. We searched for putative PREs residing in the JAK/STAT pathway genes looking at the results of the ChIP-on-chip experiments performed with PcG proteins. We found that the *outstretched* gene, encoding the Unpaired (UPD) protein, and the *unpaired 2* gene, encoding Unpaired 2 (UPD2), both of which are cytokines that activate the JAK/STAT pathway, contain PREs which are bound by PcG/trxG proteins.<sup>8,41-43</sup> We therefore investigated the expression of *Upd* (*os*) in the PH-induced overgrowths. *Upd* (*os*) mRNA expression is seen in few cells of wild type imaginal discs<sup>44</sup> (Fig. 3A). In contrast, overgrown *sdGAL4;UAS-ph-GFP/+* wing imaginal discs show expression of *Upd* (*os*) in many more cells (Fig. 3E). Quantification of *Upd* (*os*) and *Upd2* mRNA levels in *sdGAL4;UAS-ph-GFP/+* wing imaginal discs compared to control discs by quantitative RT-PCR showed a 17-fold and a 32-fold increased in expression level, respectively (Fig. 3M). Using the *stat-lacZ* transgenic flies we examined whether the expression of the *stat92E* gene is also upregulated in *sdGAL4;UAS-ph-GFP/+* wing discs as a consequence of Unpaired upregulation. Figure 3F shows that  $\beta$ -GAL expression in *sdGAL4;UAS-ph-GFP/+; stat-lacZ/+* imaginal discs is increased compared with its expression in *stat-lacZ* imaginal discs (Fig. 3B). These results indicate that induction of high levels of PH expression and the



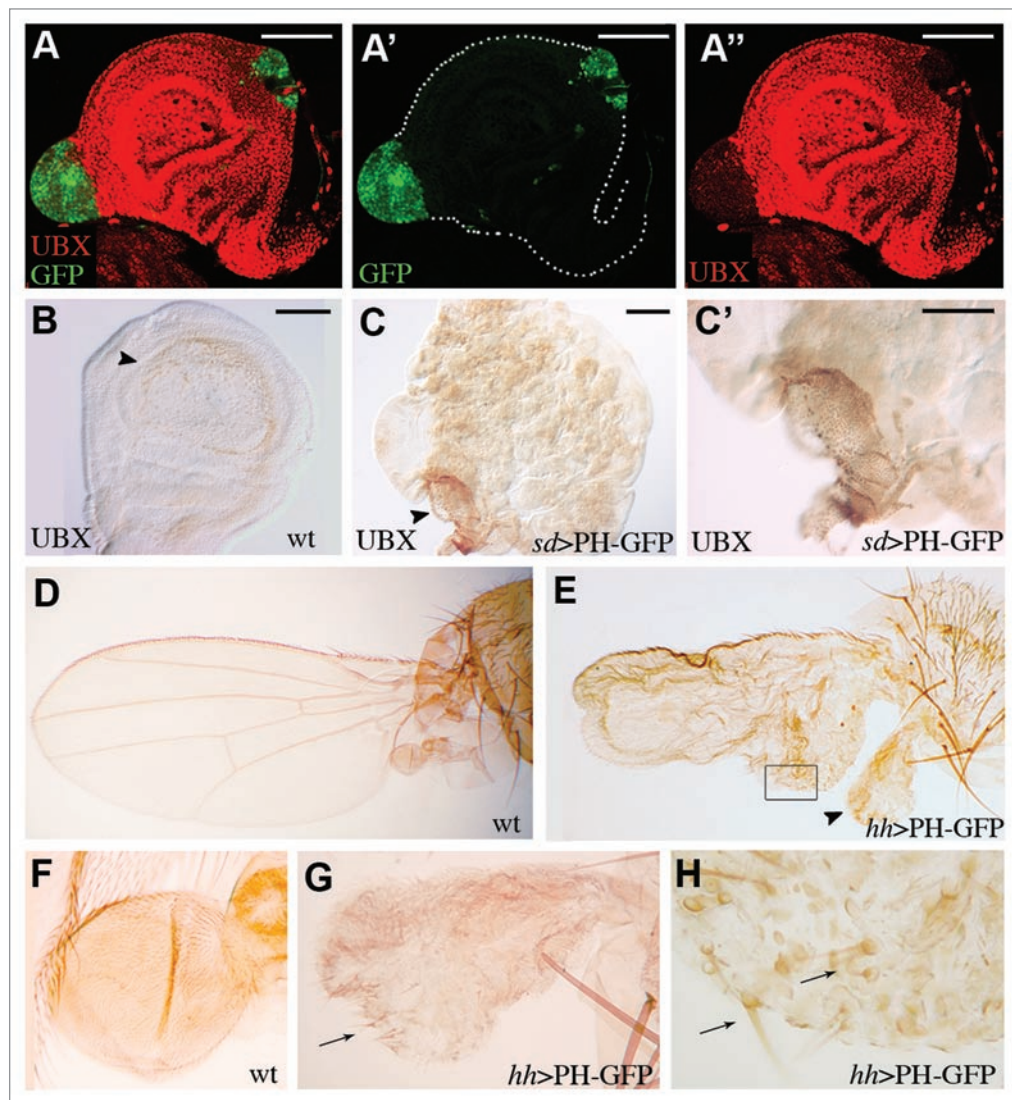
**Figure 1.** High levels of Polyhomeotic induces hyperplastic overgrowth and induction of apoptosis. (A) Map of the *ph* locus containing the *php* and *phd* transcription units and the structure of the PH proteins. The conserved HD1, FCS-Zn Finger and SAM domains are indicated. (B–L) show wing imaginal discs from the indicated larvae (B) GFP expression in *sd-Gal4;UAS-GFP/+* showing the domain of *sd-Gal4* line in the wing disc pouch (C) GFP expression in *hh-Gal4;UAS-GFP/+* showing the domain of expression of the *hh-Gal4* line in the posterior compartment of the wing disc (D) Caspase 3 (C3) staining in wild type wing disc (E)  $\beta$ -GAL expression in *puc-lacZ/+* (F)  $\beta$ -GAL expression in *rpr-lacZ/+* (G) GFP expression in *sd-Gal4;UAS-PH-GFP/+* (note the overgrowths) (G') PH protein expression in the same disc (G'') merge of (G and G'). (H) GFP expression in *tub-Gal80<sup>ts</sup>/UAS-ph-GFP; hh-Gal4/+* (H') PH3 (phosphoHistone-3 expression) expression in the same disc. Note the increased proliferation in the posterior compartment due to overexpression of PH under the control of *hh-Gal4* line (H'') merge of (H and H') (I) GFP expression in *tub-Gal80<sup>ts</sup>/UAS-ph-GFP; hh-Gal4/+* (I') WG expression in the same disc. Note the generation of multiple winglets (I'') merge of (I and I'). (J) GFP expression in *sd-Gal4;UAS-ph-GFP/+* (J') caspase 3 (C3) staining in the same disc (J'') merge of (J and J'). (K)  $\beta$ -GAL expression in *tub-Gal80<sup>ts</sup>/UAS-ph-GFP; ptc-Gal4/puc-lacZ* (K') caspase (C3) staining in the same disc (K'') merge of (K and K'). (L) GFP expression *tub-Gal80<sup>ts</sup>/rpr-lacZ; UAS-ph-GFP/hh-Gal4* (L')  $\beta$ -GAL expression in the same disc (L'') merge of (L and L'). Abbreviations: ph (polyhomeotic), sd (scalloped), hh (hedgehog), ptc (patched), wg (wingless), rpr (reaper), puc (puckered), C3 (Activated Caspase 3), PH3 (phosphoHistone-3).

resulting de-regulation of epigenetic control causes the activation of the JAK/STAT pathway, which in turn, induces uncontrolled proliferation.

To demonstrate the functional requirement of the JAK/STAT pathway in the PH-induced hyperplasia, the activation of the pathway was inhibited by *Dome<sup>ACYT</sup>*, a truncated version of DOME that lacks the intracellular protein domain involved in signal transduction.<sup>45</sup> *sdGAL4;UAS-dome<sup>ACYT</sup>/+ ; UAS-ph-GFP/+* wing imaginal discs show a greatly reduced overgrowth phenotype (Fig. 3L, see Materials and Methods) indicating the functional requirement of the JAK/STAT pathway for PH-mediated induction of hyperplastic growth.

We next studied the putative JAK/STAT targets responsible for PH-induced overgrowth. It is well established that *decapentaplegic* (DPP) signalling is linked to growth (reviewed in ref. 46). Loss of DPP expression causes wing growth arrest while gain of DPP signaling causes wing overgrowth and subsequent formation of extra winglets, very similar to the winglets generated by the PH overexpression (Fig. 1I' and I''). We first sought to show the involvement of DPP in the PH-induced overgrowth phenotype examining *dpp* expression by in situ hybridization. We found that *dpp* expression is upregulated in the PH-induced overgrown discs (Fig. 3G). Additionally, we found that *dpp* mRNA expression is increased 2.6-fold in *sdGAL4;UAS-ph-GFP/+* discs relative to





**Figure 2.** High levels of Polyhomeotic induces tissue differentiation and homeotic transformations. (A) Merged image of a *hs-FLP; actin <y+>* Gal4,UAS-GFP/UAS-*ph* haltere disc showing PH-overexpressing clones (green) and UBX expression (red) (A') GFP expression (green) (A'') UBX expression (red). Note the repression of UBX in the outgrowth clones (B) wild type wing imaginal discs showing the expression of UBX in the peripodial membrane (arrowhead) (C) UBX expression in a *sd-Gal4; UAS-ph-GFP/+* wing disc. Note the overgrowth disc showing very weak expression in the proper disc but expression in the peripodial membrane (arrowhead) (C') Magnification of (C). (D) Adult wild type wing and haltere (E) Adult *tub-Gal80<sup>ts</sup>/UAS-ph-GFP; hh-Gal4/+* showing overgrowth wing and haltere (F) Adult wild type haltere (G) Magnification of the haltere shown in (E): note the transformation towards wing indicated by the size, shape and wing bristles (H) Magnification of the wing shown in (E): note that bristles in the posterior compartment have anterior identity. Abbreviations: ph (polyhomeotic), sd (scalloped), hh (hedgehog), UBX (Ultrabithorax).

the control wing discs (Fig. 3M). These results indicate that the growth gene *dpp* is activated in response to the high levels of PH. The upregulation of *dpp* expression may be due to an effect of PH on *dpp* transcription mediated through the PRE found in the *dpp* promoter<sup>42</sup> and not to as a consequence of JAK/STAT activation. To test this we used *dpp-lacZ* transgenic flies as a reporter for *dpp* expression. Importantly, the *dpp-lacZ*<sup>BS3.0</sup> construct<sup>46</sup> does not include the *dpp* PRE but does contain STAT consensus binding sites (Suppl. Fig. 2). As shown (Fig. 3H–H''),  $\beta$ -GAL expression is de-repressed in *tub-Gal80<sup>ts</sup>/UAS-ph-GFP/+;hh-Gal4/dpp-lacZ* wing discs. These results argue against a direct effect of PH overexpression on *dpp* activation and suggest that *dpp* upregulation

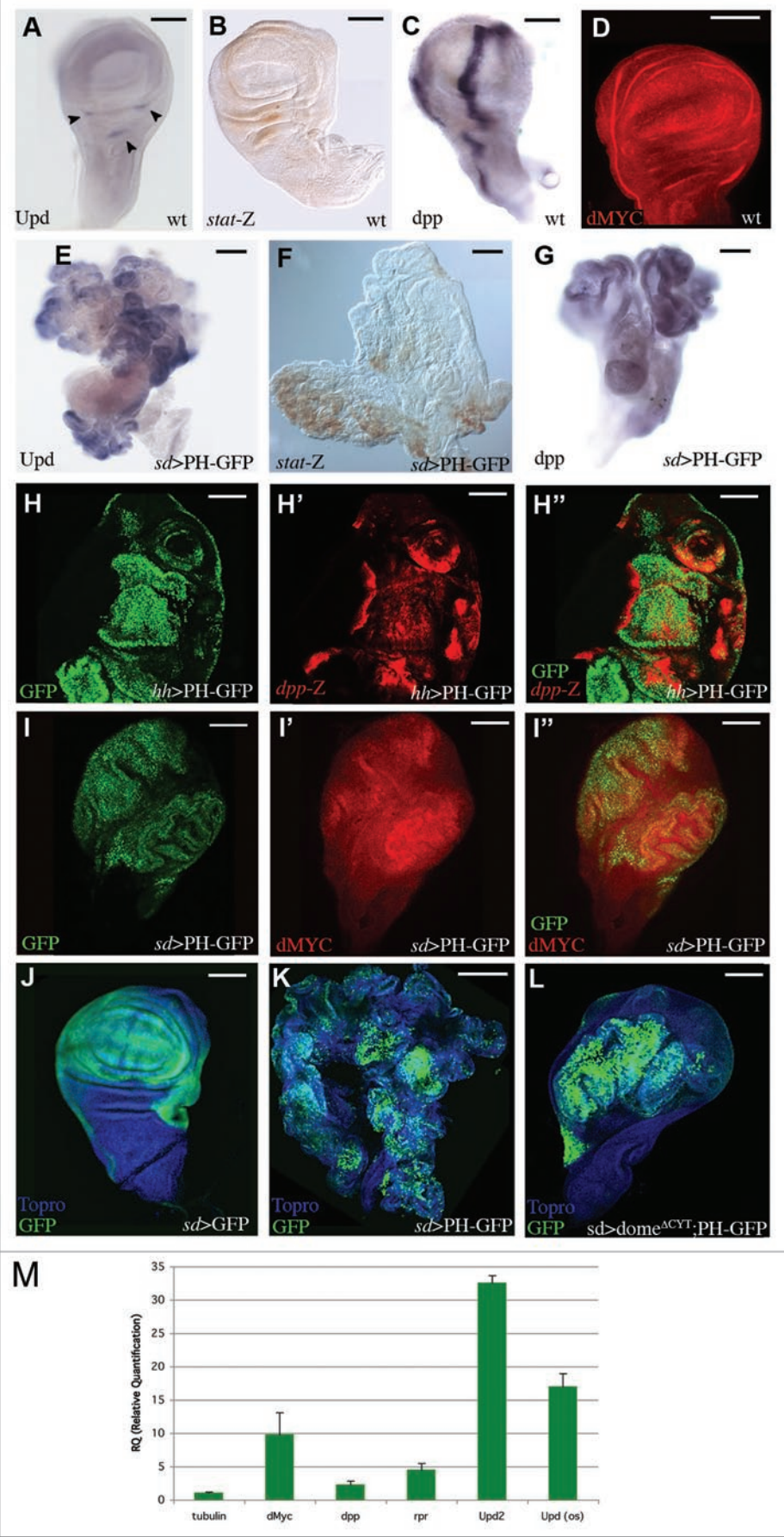
found in the PH-induced overgrowths could be a partial consequence of activation of the JAK/STAT. This is consistent with recent results showing that ectopic activation of the JAK/STAT pathway in the support cells in the Drosophila ovarian niche causes a similar increase of *dpp* mRNA expression.<sup>47,48</sup>

The *d-myc* oncogene is another factor involved in controlling Drosophila developmental growth. Its human homolog, c-myc is upregulated in many cancers.<sup>49</sup> We examined the expression of *d-myc* in PH-induced tumors in *sdGAL4;UAS-ph-GFP/+* wing discs and found that its expression is induced in the overgrowth (Fig. 3I–I''). Additionally, we found that the levels of *d-myc* mRNA levels are upregulated 11.6-fold relative to control

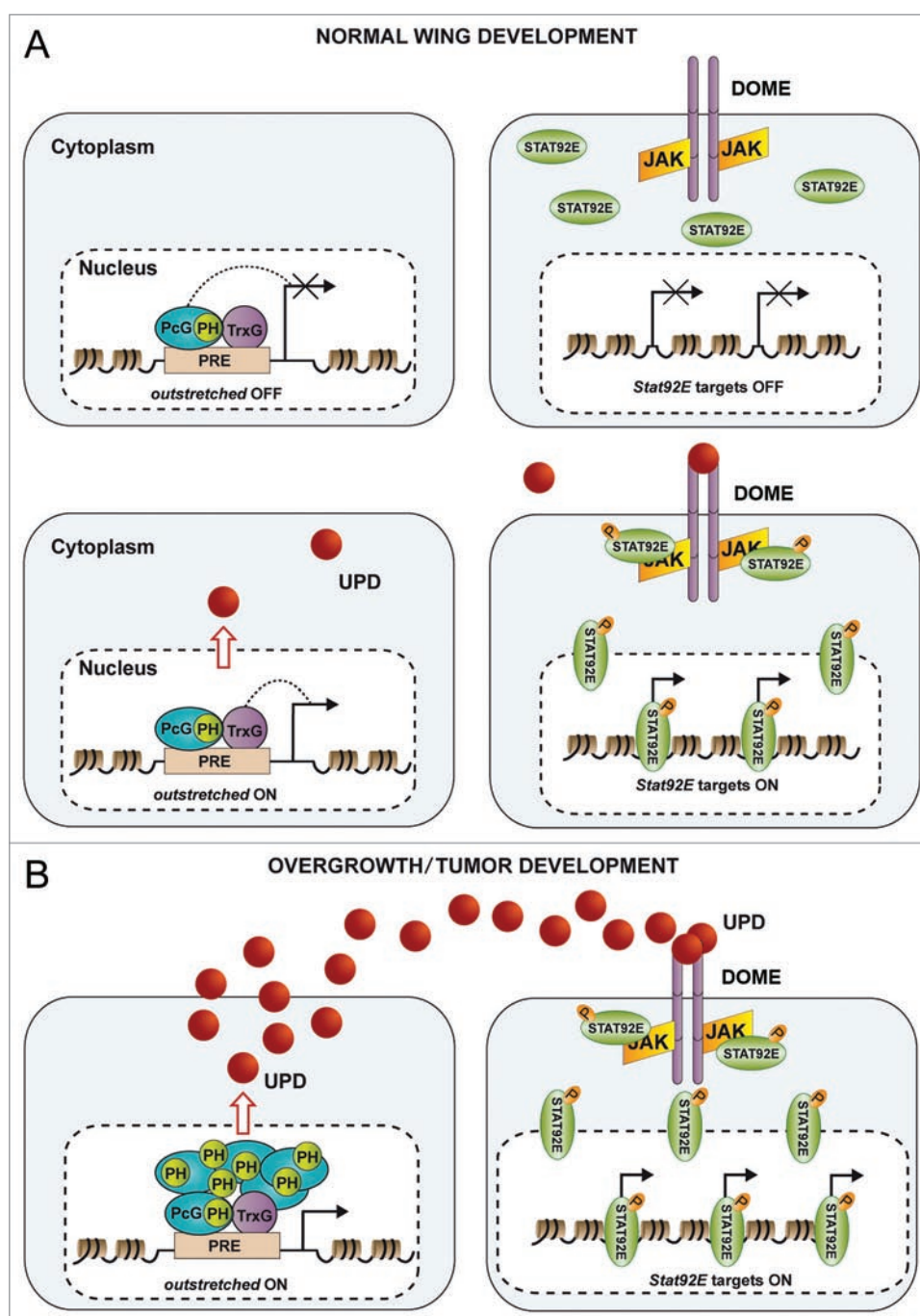
**Figure 3.** High levels of PH activate the JAK/STAT pathway as well as *dpp* and *d-myc* expression. Wing imaginal discs are shown in all the following panels (A) wild type expression *Upd-2* mRNA (arrows): note that only few cells of the disc show *Upd-2* mRNA (B)  $\beta$ -GAL expression in *stat-lacZ/+* (C) Wild type *dpp* mRNA expression (D) d-Myc wild type expression (E) *Upd-2* mRNA expression in *sd-Gal4;UAS-ph-GFP/+*: note the massive proliferation and the upregulation of *Upd-2* expression (F)  $\beta$ -GAL expression in *sd-Gal4;UAS-ph-GFP/stat-lacZ*: note the upregulation of *stat* expression (G) *dpp* mRNA expression in *sd-Gal4;UAS-ph-GFP/+* (H) GFP expression in *tub-Gal80<sup>ts</sup>/dpp-lacZ; UAS-ph-GFP/hh-Gal4* (H')  $\beta$ -GAL expression in the same disc (H'') Merged of (H and H'). (I) GFP expression in *sd-Gal4;UAS-ph-GFP/+* (I') d-MYC expression in the same disc (I'') Merged of (I and I'). (J) GFP expression (green) in control *sd-Gal4;UAS-GFP/+* wing disc stained with Topro (blue) (K) GFP expression in *sd-Gal4; UAS-ph-GFP/+* wing disc stained with Topro (blue) (L) GFP expression in *sd-Gal4; UAS-dome<sup>ΔCYT</sup>/+; UAS-GFP/+* wing disc stained with Topro (blue). Note that proliferation is greatly reduced in (L) compared to (K) and that (J–L) wing discs were dissected and stained from third instar larvae grown at the same temperature (M) Table showing the quantitative RT-PCR results. RQ: Relative Quantification of mRNA. Abbreviations: ph (polyhomeotic), Upd (Unpaired), dpp (decapentaplegic), sd (scalloped), hh (hedgehog).

wing discs (Fig. 3M). This result is in agreement with the results showing that stat-activated expression of c-myc can account, at least in part, for the proliferative effect associated with JAK/STAT pathway activation.<sup>50</sup> Taken together, these results show that the over proliferation induced by high levels of PH is mediated by the activation of the JAK/STAT pathway and that this pathway functions via activation of growth genes like *dpp* and *d-myc*.

The upregulation of *d-myc* expression could be related to the high rates of apoptosis found in the PH-induced overgrowths (Fig. 1J–L) that, interestingly, still allow the observed massive proliferation. Activation of apoptosis could be due to de-repression of the apoptotic genes, like *reaper* where functional PREs have been found.<sup>51,52</sup> We have observed a 4-fold increase of mRNA *reaper* expression (Fig. 3M) and activation of the expression of *reaper-lacZ* (Fig. 1L'). Alternatively,







**Figure 4.** A model explaining PcG/trxG protein control the state of JAK/STAT pathway activation. PcG/trxG bind to the PREs located in the Unpaired coding genes, like the *outstretched* gene, (for simplification only the PRE of the *outstretched* gene is indicated) and epigenetically control its transcriptional state. Activation or repression of *outstretched* is modulated in response to the expression requirements of Unpaired for normal wing development. Under pathological conditions the PcG/trxG biochemical activities or RNA expression levels of PcG/trxG are modified resulting in upregulation of Unpaired expression with subsequent aberrant activation of the JAK/STAT pathway and tumor development. Signals modulating the activity and or levels of PcG/trxG expression in normal and pathological development remain to be elucidated.

apoptosis may be additionally due to discontinuity generated in the reception of *dpp* or *wg* signals<sup>53</sup> that we also observe in PH-overexpressing wing discs (data not shown). However, it has been demonstrated that *Drosophila* imaginal cells expressing higher levels of dMyc protein are capable of inducing cell death in neighboring cells.<sup>54,55</sup> Therefore, the activation of *d-myc*

may also contribute to the apoptosis observed in PH-induced overgrowths.

We have shown that tissue overgrowth promoted by high levels of the epigenetic protein PH is mediated, at least in part, by the activation of the JAK/STAT pathway. We propose that the PcG/trxG proteins regulate the JAK/STAT pathway

via interaction with the PREs located in the Unpaired coding genes like the *outstretched* gene<sup>42</sup> (Fig. 4). During normal wing development cytokine expression is maintained ON/OFF depending on the JAK/STAT pathway requirement for proliferation (Fig. 4A). However, in response to stress signals (Fig. 4B), epigenetic regulation mediated by PcG proteins is altered thus allowing activation of cytokine expression and the subsequent aberrant activation of the JAK/STAT pathway leading to tissue overgrowth and tumorigenesis. Signals that regulate the state of PcG activity/expression and consequent JAK/STAT modulation remain to be elucidated. We observed upregulation of the JNK pathways in the PH-induced proliferating tissues. Perhaps, as found in the processes of tissue trans-determination and tissue regeneration,<sup>56</sup> activation of JNK could also influence the epigenetic state of the PcG proteins and trigger over proliferation.

The experiments presented here provide the tools to pursue the basis of PcG regulation of the JAK/STAT pathway as well as highlight the interest in the study of epigenetic regulation of proliferation and its relevance to human cancer research.<sup>49</sup>

## Materials and Methods

**Drosophila strains, handling and genetics.** The GAL4/UAS system<sup>35</sup> was used at different temperatures ranging from 17°C to 29°C with the GAL4 drivers *scalloped*-Gal4 (*sd*-Gal4) (Morata G and Calleja M, unpublished), *hedgehog*-Gal4 (*hh*-Gal4), *patched*-Gal4 (*ptc*-Gal4) (Flybase, <http://flybase.bio.indiana.edu>) and transgenic flies containing the constructs that express the PH-P protein *P[UAS: ph-EGFP]<sup>m-20</sup>*,<sup>57</sup> and *P[UAS: ph]<sup>1-7</sup>* and the *P[UAS: dome<sup>ΔCYT</sup>]*.<sup>45</sup> *P-lacZ* strains *dpp-lacZ<sup>BS3.0</sup>*,<sup>46</sup> *puc-lacZ* (*puckered-lacZ<sup>E69</sup>*),<sup>58</sup> *rpr-lacZ* (*reaper-4kb-lacZ*)<sup>59</sup> and *wg-lacZ*, (*wingless-lacZ*, Flybase), were used as reporters of the expression of the corresponding genes.

To generate PH overexpressing clones during larval development females *y<sup>1</sup>w<sup>118</sup>*, *P[hsp70-FLP122]*; *actin FRT [y+] FRT Gal4*, *P[UAS-GFP]/SM5*,<sup>60</sup> were crossed with males *If/CyO*; *P[UAS: ph]<sup>1-7</sup>*. The larval progeny were heat shocked at 37°C degrees for 10 minutes and placed at 29° degrees until they reach the third instar larval stage. The Gal80<sup>ts</sup>/Gal4 System<sup>37</sup> was used to control the time of expression of the PH protein using the stocks *tub-Gal80<sup>ts</sup>/CyO*; *hh-Gal4/TM6B* and *ptc-Gal4/CyO*; *tub-Gal80<sup>ts</sup>/TM6B*. To control that the reduction of growth observed in *sdGAL4; UAS-dome<sup>ΔCYT</sup>+*; *UAS-ph-GFP/+* compared to *sdGAL4; UAS-ph-GFP/+* was not due to depletion of GAL4, the growth of imaginal discs from *sdGAL4; UAS-GFP/+*; *UAS-ph-GFP/+* larvae was also studied at the same temperature conditions as *sdGAL4; UAS-dome<sup>ΔCYT</sup>+*; *UAS-ph-GFP/+* and *sdGAL4; UAS-ph-GFP/+*.

**Immunostaining.** Imaginal discs were dissected and stained as previously described.<sup>51</sup> The primary antibodies used were rabbit anti-GFP (1:300, Invitrogen), rabbit anti-PH<sup>61</sup> (1:200), mouse anti-β-gal (1:200, Promega), rabbit anti-phospho-Histone-3 (1:100, Upstate), rabbit anti-C3 (1:200, Cell Signalling Technologies), mouse anti-wingless (1:25, Iowa Hybridoma Bank), mouse anti-UBX<sup>38</sup> (1:20), guinea-pig anti-dMyc<sup>62</sup> (1:100)

and mouse anti-Abd-B<sup>39</sup> (1:20). Secondary fluorescent antibodies were coupled to Rhodamin RedX, FYCT and Cys-5 (Jackson Immuno Research). The ABC Elite kit (Vector Laboratories) was used for stains with HRP-peroxidase following standard protocols. Images were generated using a Zeiss CDD microscope, a MicroRadiance (Bio-Rad) confocal and a LSM510 META (Zeiss) confocal microscope and subsequently processed using Adobe Photoshop CS3.

**In situ hybridization.** Imaginal discs of *sd*-Gal4; *P[UAS: ph-EGFP]<sup>m-20</sup>/+* larvae and of *sd*-Gal4; *P[UAS:GFP]/+* (used as control) were hybridized with a *dpp* cDNA probe or a *upd(os)* cDNA probe following standard protocols.<sup>63</sup>

**Quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR).** Total RNA from 100 wing imaginal discs of experimental *sd*-Gal4; *P[UAS: ph-EGFP]<sup>m-20</sup>/+* and control *sd*-Gal4; *P[UAS:GFP]/+* larvae was isolated as previously described.<sup>51</sup> One microgram of RNA was used as a template for first-strand cDNA synthesis using the High-Capacity cDNA Reverse transcription Kit (Applied Biosystems) following manufacturer directions. Real Time-PCR reactions were performed at the Lausanne DNA Array Facility using LightCycler FastStart DNA MasterSYBR Green I kit (Roche) following manufacturer instructions. The DNA sequences of the oligonucleotides used in the experiment are:

*php* 5'-ATC TGC TCA GGT CCA CCA AC-3' and 5'-CAG TGG AAA GGT GAC CCA CT-3'; *Upd (os)* 5'-CCA CGT AAG TTT GCA TGT TG-3' and 5'-CTA AAC AGT AGC CAG GAC TC-3'; *Upd2* 5'-AGC GCC AGC CAA GGA CGA GTT ATC-3' and 5'-TTG GCT GGC GTG TGA AAG TTG AGA-3'; *dpp* 5'-GCC AAC ACA GTG CGA AGT TTT A-3' and 5'-TGG TGC GGA AAT CGA TCG T-3'; *d-myc* 5'-CAG TTC CAG TTC GCA GTC AA-3' and 5'-AGA TAA ACG CTG CTG GAG GA-3'; *rpr* 5'-AGG CGA CTC TGT TGC GGG AG-3' and 5'-TGC GAT GGC TTG CGA TAT TTG-3'; the tubulin 5'-TCC AAT CGC AAC AAA AAA TTC A-3' and 5'-TCG TTT TCG TAT GCT TTT CAG TGT-3' was used as endogenous control. Quantified mRNA levels were expressed as relative fold change normalized to *tubulin*.

## Acknowledgements

We are grateful to our colleagues Ricardo Aparicio and Keith Harshman for discussions and critically reading the manuscript. We thank James Castelli-Gair Hombria, Maria Martín, Francisco Martín and Florence Maschat for their generous gift of the *upd2* probe, *dpp* probe, anti-myc antibody, and anti-PH antibody respectively. The qPCR experiments were performed at the DNA Array Facility of the Center for Integrative Genomics, University of Lausanne with the expert assistance of Hannes Richter. We also thank Laurent Théodore for the *P[UAS:ph-EGFP]* flies, Florence Maschat for the *P[UAS:ph]* flies, Jose Belio for help with the Figure 4, Alfredo Villasante for help with genome blast, the Bloomington Stock Center, the Iowa Hybridoma Bank and the Madrid Drosophila Community for reagents and discussions. This work was supported by grants from the Dirección General de Investigación (BFU 2008-01154), Fundación Investigación Médica Mutua Madrileña



(FMM-2006), the Consolider Ingenio 2010 Program of the Ministerio de Ciencia e Innovación (CSD 2007-00008) to A.B. and by an institutional grant to the Centro de Biología Molecular Severo Ochoa from the Fundación Ramón Areces.

## References

- Kiefer JC. Epigenetics in development. *Dev Dyn* 2007; 236:1144-56.
- Martinez AM, Cavalli G. The role of polycomb group proteins in cell cycle regulation during development. *Cell Cycle* 2006; 5:1189-97.
- Burdach S, Plehm S, Unland R, Dirksen U, Borkhardt A, Stage MS, et al. Epigenetic maintenance of stemness and malignancy in peripheral neuroectodermal tumors by EZH2. *Cell Cycle* 2009; 8:1991-6.
- Lund AH, van Lohuizen M. Epigenetics and cancer. *Genes Dev* 2004; 18:2315-35.
- Pasini D, Bracken AP, Helin K. Polycomb group proteins in cell cycle progression and cancer. *Cell Cycle* 2004; 3:396-400.
- Jurgens G. A group of genes controlling the spatial expression of the bithorax complex in *Drosophila*. *Nature* 1985; 316:153-5.
- Ferres-Marco D, Gutierrez-Garcia I, Vallejo DM, Bolivar J, Gutierrez-Avino FJ, Dominguez M. Epigenetic silencers and Notch collaborate to promote malignant tumours by Rb silencing. *Nature* 2006; 439:430-6.
- Oktaba K, Gutierrez L, Gagneur J, Girardot C, Sengupta AK, Furlong EE, et al. Dynamic regulation by polycomb group protein complexes controls pattern formation and the cell cycle in *Drosophila*. *Dev Cell* 2008; 15:877-89.
- Pietersen AM, van Lohuizen M. Stem cell regulation by polycomb repressors: postponing commitment. *Curr Opin Cell Biol* 2008; 20:201-7.
- Probst AV, Dunleavy E, Almouzni G. Epigenetic inheritance during the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10:192-206.
- Remillieux-Leschelle N, Santamaria P, Randsholt NB. Regulation of larval hematopoiesis in *Drosophila melanogaster*: a role for the multi sex combs gene. *Genetics* 2002; 162:1259-74.
- Muller J, Verrijzer P. Biochemical mechanisms of gene regulation by polycomb group protein complexes. *Curr Opin Genet Dev* 2009; 19:150-8.
- Shao Z, Raible F, Mollaaghababa R, Guyon JR, Wu CT, Bender W, et al. Stabilization of chromatin structure by PRC1, a Polycomb complex. *Cell* 1999; 98:37-46.
- Czermin B, Melfi R, McCabe D, Seitz V, Imhof A, Pirrotta V. *Drosophila* enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites. *Cell* 2002; 111:185-96.
- Muller J, Hart CM, Francis NJ, Vargas ML, Sengupta A, Wild B, et al. Histone methyltransferase activity of a *Drosophila* Polycomb group repressor complex. *Cell* 2002; 111:197-208.
- Klymenko T, Papp B, Fischle W, Kocher T, Schelder M, Fritsch C, et al. A Polycomb group protein complex with sequence-specific DNA-binding and selective methyl-lysine-binding activities. *Genes Dev* 2006; 20:1110-22.
- Ringrose L, Paro R. Polycomb/Trithorax response elements and epigenetic memory of cell identity. *Development* 2007; 134:223-32.
- Isono K, Fujimura Y, Shinga J, Yamaki M, J OW, Takihara Y, et al. Mammalian polyhomeotic homologues Phc2 and Phc1 act in synergy to mediate polycomb repression of Hox genes. *Mol Cell Biol* 2005; 25:6694-706.
- Dukers DF, van Galen JC, Giroth C, Jansen P, Sewalt RG, Otte AP, et al. Unique polycomb gene expression pattern in Hodgkin's lymphoma and Hodgkin's lymphoma-derived cell lines. *Am J Pathol* 2004; 164:873-81.
- Raaphorst FM, Vermeer M, Fieret E, Blokzijl T, Dukers D, Sewalt RG, et al. Site-specific expression of polycomb-group genes encoding the HPC-HPH/PRC1 complex in clinically defined primary nodal and cutaneous large B-cell lymphomas. *Am J Pathol* 2004; 164:533-42.
- Sanchez-Beato M, Sanchez E, Garcia JF, Perez-Rosado A, Montoya MC, Fraga M, et al. Abnormal PcG protein expression in Hodgkin's lymphoma. Relation with E2F6 and NFkappaB transcription factors. *J Pathol* 2004; 204:528-37.
- Sanchez-Beato M, Sanchez E, Gonzalez-Carrero J, Morente M, Diez A, Sanchez-Verde L, et al. Variability in the expression of polycomb proteins in different normal and tumoral tissues. A pilot study using tissue microarrays. *Mod Pathol* 2006; 19:684-94.
- Hariharan IK, Bilder D. Regulation of imaginal disc growth by tumor-suppressor genes in *Drosophila*. *Annu Rev Genet* 2006; 40:335-61.
- Pagliarini RA, Quinones AT, Xu T. Analyzing the function of tumor suppressor genes using a *Drosophila* model. *Methods Mol Biol* 2003; 223:349-82.
- Arbouzova NI, Zeidler MP. JAK/STAT signalling in *Drosophila*: insights into conserved regulatory and cellular functions. *Development* 2006; 133:2605-16.
- Bagnyukova TV, Tryndyak VP, Muskhelishvili L, Ross SA, Beland FA, Pogribny IP. Epigenetic downregulation of the suppressor of cytokine signaling 1 (Socs1) gene is associated with the STAT3 activation and development of hepatocellular carcinoma induced by methyl-deficiency in rats. *Cell Cycle* 2008; 7:3202-10.
- Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R. STATs in oncogenesis. *Oncogene* 2000; 19:2474-88.
- Inghirami G, Chiarle R, Simmons WJ, Piva R, Schlessinger K, Levy DE. New and old functions of STAT3: a pivotal target for individualized treatment of cancer. *Cell Cycle* 2005; 4:1131-3.
- Limnander A, Rothman PB. Abl oncogene bypasses normal regulation of Jak/STAT activation. *Cell Cycle* 2004; 3:1486-8.
- Hombria JC, Brown S. The fertile field of *Drosophila* Jak/STAT signalling. *Curr Biol* 2002; 12:569-75.
- Baeg GH, Zhou R, Perrimon N. Genome-wide RNAi analysis of JAK/STAT signaling components in *Drosophila*. *Genes Dev* 2005; 19:1861-70.
- Muller P, Kutenkeuler D, Gesellchen V, Zeidler MP, Boutros M. Identification of JAK/STAT signalling components by genome-wide RNA interference. *Nature* 2005; 436:871-5.
- Dura JM, Randsholt NB, Deatrck J, Erk I, Santamaria P, Freeman JD, et al. A complex genetic locus, polyhomeotic, is required for segmental specification and epidermal development in *D. melanogaster*. *Cell* 1987; 51:829-39.
- Franke A, DeCamillis M, Zink D, Cheng N, Brock HW, Paro R. Polycomb and polyhomeotic are constituents of a multimeric protein complex in chromatin of *Drosophila melanogaster*. *EMBO J* 1992; 11:2941-50.
- Brand AH, Manoukian AS, Perrimon N. Ectopic expression in *Drosophila*. *Methods Cell Biol* 1994; 44:635-54.
- Woods DF, Wu JW, Bryant PJ. Localization of proteins to the apico-lateral junctions of *Drosophila* epithelia. *Dev Genet* 1997; 20:111-8.
- McGuire SE, Le PT, Osborn AJ, Matsumoto K, Davis RL. Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila*. *Science* 2003; 302:1765-8.
- White RA, Wilcox M. Protein products of the bithorax complex in *Drosophila*. *Cell* 1984; 39:163-71.
- Celniker SE, Keelan DJ, Lewis EB. The molecular genetics of the bithorax complex of *Drosophila*: characterization of the products of the Abdominal-B domain. *Genes Dev* 1989; 3:1424-36.
- Beuchle D, Struhl G, Muller J. Polycomb group proteins and heritable silencing of *Drosophila* Hox genes. *Development* 2001; 128:993-1004.
- Kwong C, Adryan B, Bell I, Meadows L, Russell S, Manak JR, et al. Stability and dynamics of polycomb target sites in *Drosophila* development. *PLoS Genet* 2008; 4:1000178.
- Schuettengruber B, Ganapathi M, Leblanc B, Portoso M, Jaschek R, Tolhuis B, et al. Functional anatomy of polycomb and trithorax chromatin landscapes in *Drosophila* embryos. *PLoS Biol* 2009; 7:13.
- Schwartz YB, Kahn TG, Nix DA, Li XY, Bourgon R, Biggin M, et al. Genome-wide analysis of Polycomb targets in *Drosophila melanogaster*. *Nat Genet* 2006; 38:700-5.
- Mukherjee T, Hombria JC, Zeidler MP. Opposing roles for *Drosophila* JAK/STAT signalling during cellular proliferation. *Oncogene* 2005; 24:2503-11.
- Brown S, Hu N, Hombria JC. Identification of the first invertebrate interleukin JAK/STAT receptor, the *Drosophila* gene domeless. *Curr Biol* 2001; 11:1700-5.
- Blackman RK, Sanicola M, Raftery LA, Gillevet T, Gelbart WM. An extensive 3' cis-regulatory region directs the imaginal disk expression of decapentaplegic, a member of the TGFbeta family in *Drosophila*. *Development* 1991; 111:657-66.
- Lopez-Onieva L, Fernandez-Minan A, Gonzalez-Reyes A. Jak/Stat signalling in niche support cells regulates dpp transcription to control germline stem cell maintenance in the *Drosophila* ovary. *Development* 2008; 135:533-40.
- Wang L, Li Z, Cai Y. The JAK/STAT pathway positively regulates DPP signaling in the *Drosophila* germline stem cell niche. *J Cell Biol* 2008; 180:721-8.
- Eilers M, Eisenman RN. Myc's broad reach. *Genes Dev* 2008; 22:2755-66.
- Kiuchi N, Nakajima K, Ichiba M, Fukada T, Narimatsu M, Mizuno K, et al. STAT3 is required for the gp130-mediated full activation of the c-myc gene. *J Exp Med* 1999; 189:63-73.
- Gonzalez I, Busturia A. High levels of dRYBP induce apoptosis in *Drosophila* imaginal cells through the activation of reaper and the requirement of trithorax, dredd and dFADD. *Cell Res* 2009; 19:747-57.
- Zhang Y, Lin N, Carroll PM, Chan G, Guan B, Xiao H, et al. Epigenetic blocking of an enhancer region controls irradiation-induced proapoptotic gene expression in *Drosophila* embryos. *Dev Cell* 2008; 14:481-93.
- Adachi-Yamada T, Fujimura-Kamada K, Nishida Y, Matsumoto K. Distortion of proximodistal information causes JNK-dependent apoptosis in *Drosophila* wing. *Nature* 1999; 400:166-9.
- de la Cova C, Abril M, Bellosta P, Gallant P, Johnston LA. *Drosophila* myc regulates organ size by inducing cell competition. *Cell* 2004; 117:107-16.
- Moreno E, Basler K. dMyc transforms cells into supercompetitors. *Cell* 2004; 117:117-29.

## Note

Supplementary materials can be found at: [www.landesbioscience.com/supplement/GonzalezCC8-24-Sup.pdf](http://www.landesbioscience.com/supplement/GonzalezCC8-24-Sup.pdf)

56. Lee N, Maurange C, Ringrose L, Paro R. Suppression of Polycomb group proteins by JNK signalling induces transdetermination in *Drosophila* imaginal discs. *Nature* 2005; 438:234-7.
57. Netter S, Faucheux M, Theodore L. Developmental dynamics of a polyhomeotic-EGFP fusion in vivo. *DNA Cell Biol* 2001; 20:483-92.
58. Martin-Blanco E, Gampel A, Ring J, Virdee K, Kirov N, Tolkovsky AM, et al. puckered encodes a phosphatase that mediates a feedback loop regulating JNK activity during dorsal closure in *Drosophila*. *Genes Dev* 1998; 12:557-70.
59. Jiang C, Lamblin AF, Steller H, Thummel CS. A steroid-triggered transcriptional hierarchy controls salivary gland cell death during *Drosophila* metamorphosis. *Mol Cell* 2000; 5:445-55.
60. Ito K, Awano W, Suzuki K, Hiromi Y, Yamamoto D. The *Drosophila* mushroom body is a quadruple structure of clonal units each of which contains a virtually identical set of neurones and glial cells. *Development* 1997; 124:761-71.
61. DeCamillis M, Cheng NS, Pierre D, Brock HW. The polyhomeotic gene of *Drosophila* encodes a chromatin protein that shares polytene chromosome-binding sites with Polycomb. *Genes Dev* 1992; 6:223-32.
62. Herranz H, Perez L, Martin FA, Milan M. A Wingless and Notch double-repression mechanism regulates G<sub>1</sub>-S transition in the *Drosophila* wing. *EMBO J* 2008; 27:1633-45.
63. Wolff T. Histological techniques of the *Drosophila* eye. Part I: larva and pupa. In *Drosophila* Protocols (Sullivan W, Ashburner M, Hawley RS, ed.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press 2000; 201-27.

©2009 Landes Bioscience.  
Do not distribute.

